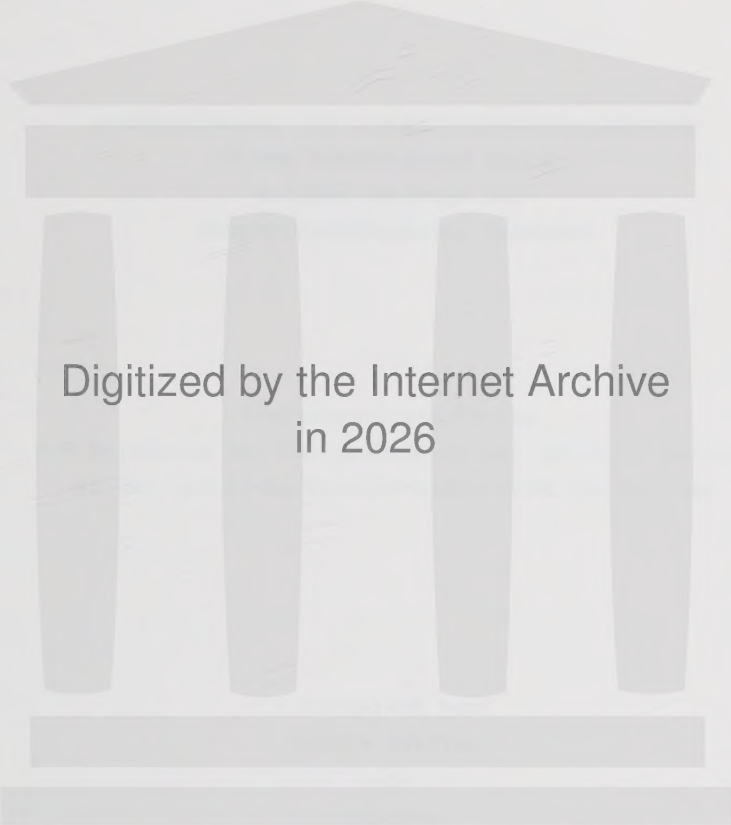


UNTERSUCHUNGEN ZUR
CHOLESTERINKRISTALLBILDUNG
IN DER MENSCHLICHEN GALLE:
BILIÄRE PROTEINE ALS
NUKLEATIONSFÖRDERNDE
FAKTOREN

Ursula Seidler

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0050

Aus der II. Medizinischen Klinik Großhadern der Universität München
Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner

**UNTERSUCHUNGEN ZUR CHOLESTERINKRISTALLBILDUNG
IN DER MENSCHLICHEN GALLE:
BILIÄRE PROTEINE ALS
NUKLEATIONSFÖRDERNDE FAKTOREN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Ursula Seidler
aus
München
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. D. Jüngst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.1985

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner danke ich für die Überlassung dieser Promotionsarbeit, seine Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R.T. Holzbach, Leiter der Gastrointestinal Research Unit, Cleveland Clinic Foundation, Ohio, für die guten Arbeitsbedingungen in seinem Labor, seine Hilfe und fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. R. E. Hermann, Chairman des Departments of General Surgery, und Dr. N. Stowe Ph.D., Leiter der Forschungsabteilung für Nephrologie, Cleveland Clinic Foundation, möchte ich herzlich danken für ihre Unterstützung bei der Beschaffung der menschlichen Gallenproben.

PD Dr. D. Jüngst und Dr. A. Kibe M.D., Ph.D. und Dr. M. Dudley danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau M. Marsh, Frau E. Wright, Herrn J. Navickas und Frau B. Häuserer für gewährte Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung:

Cholesterinlöslichkeit und Cholesterinnukleation in der menschlichen Galle - der entscheidende Schritt zur Entstehung von Cholesteringallensteinen	1
---	----------

Historischer Überblick	1
------------------------	---

Cholesterintransport und Cholesterinlöslichkeit in der menschlichen Galle	6
--	---

Cholesterinübersättigung und Metastabilität	9
---	---

Cholesterinnukleation und Steinwachstum	10
---	----

Nukleationsgeschwindigkeit	13
----------------------------	----

Nukleations- und Antinukleationsfaktoren in der menschlichen Galle	14
---	----

Fragestellung	19
----------------------	-----------

Material und Methoden	24
------------------------------	-----------

Probengewinnung und Aufbewahrung	24
----------------------------------	----

Chemische Analysen	25
--------------------	----

Gelelektrophorese	29
-------------------	----

Delipidisierungsverfahren	29
---------------------------	----

Nukleationsstudien	32
Ergebnisse:	
Testung der Wirksamkeit des neuen Delipidisierungsverfahrens	45
Ergebnisse der Nukleationsstudien	52
Diskussion:	
Entwicklung des Delipidisierungsverfahren	70
Diskussion der Nukleationsexperimente	76
Zusammenfassung	89
Literaturverzeichnis	94

Einleitung:

Cholesterinlöslichkeit und Cholesterinnukleation in der Galle - der entscheidende Schritt zur Entstehung von Gallensteinen

Cholesterin ist der Hauptbestandteil der meisten Gallensteine in der westlichen Welt. 70-80% aller Gallensteine in Europa und Amerika sind Cholesteringallensteine, von denen die sogenannten "reinen" Cholesteringallensteine zu über 90% aus Cholesterin bestehen und die "gemischten" zu über 70%.

Wie nun dieses in Wasser praktisch unlösliche Cholesterin in der Galle transportiert wird und warum es irgendwann aus der Lösung ausfällt, ist seit über hundert Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Denn man erkannte früh, daß in der Beantwortung dieser Frage der Schlüssel zu unserem Verständnis der Gallensteinentstehung liegt.

Historischer Überblick:

Schon in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, die Entstehung von Gallensteinen zu verstehen. Dabei wurde das ursächliche Prinzip zuerst in der Erkrankung der Gallenblase gesehen. Naunyn postulierte 1892, daß eine Entzündung der Gallenblase zur Abschlüfferung von Mukosazellen und zur Sekretion abnormer Substanzen führe, die dann mit Cholesterinkristallen vermischt zu Gallensteinen verbacken würden (136). Cushing, Gilbert, Rosenow u.a. nahmen an, daß die Ursache für die Steinentstehung in einer bakteriellen

Infektion der Gallenblasenwand liege, z.B. durch Salmonellen, und damit einhergehender Sekretion eines abnormen Proteins oder der Invasion von Entzündungszellen (37,23,162). Das dadurch entstehende Milieu in der Gallenblase sollte dann die Steinentstehung begünstigen.

Andere Forscher sahen in der Entstehung von Pigmentkonkrementen den ersten Schritt zur Steinentstehung. Diese Konkreme sollten später mit Lagen von Cholesterinkristallen umgeben werden (206,21,166).

Meckel von Helmsbach erkannte schon 1856 in der Stase der Galle in der Gallenblase und den Gallengängen einen Faktor, der die Cholesterinkristallisation begünstigte (68). Andere schlugen vor, daß die Abflußstörung die Bildung kleiner Pigmentkalkuli bewirken könnte, die ihrerseits Nukleationskerne für das Cholesterin darstellten (165). Man erkannte auch daß sich die Galle in der Gallenblase in Schichten unterschiedlicher Dichte ansammelt ("Stratifikation"), und sah darin einen Faktor, der die Gallensteinentstehung begünstigte (204,205,207,208).

Erst später suchte man das pathogenetische Prinzip der Gallensteinentstehung in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Galle selbst, vor allem ihres Lipidgehaltes und der Cholesterinlöslichkeit (107). Schon 1936 vermutete Hartley, daß das Cholesterin in der Galle in Mizellen aus Gallensalzen in Lösung gehalten wird (63). Rains untersuchte die Cholesterinlöslichkeit in verschiedenen Gallensalzlösungen und stellte eine deutliche Zunahme der Cholesterinlöslichkeit fest bei Erreichen der kritischen mizellaren Konzentration des jeweiligen Gallensalzes in der Lösung (152). Es wurde auch erkannt, daß der Cholesteringehalt der Blasengalle in Gallensteinpatienten oft höher ist als der von Normalpersonen. Zuerst nahm man an, daß Gallensalze in der kran-

ken Gallenblase resorbiert werden und dadurch der relative Anteil an Cholesterin in der Galle steige. Eine weitere Möglichkeit sah man in der Freisetzung von Cholesterin aus den Entzündungszellen, die in der kranken Gallenblase vorhanden seien (160,7).

Auf Grund dieser Experimente erkannte man die fundamentale Rolle der Cholesterinlöslichkeit in der Galle für die Entstehung von Gallensteinen (81,82,83,84,85,133). Vor allem Isaakson in Schweden versuchte, die relativen Verhältnisse von Gallensalzen, Lezithin und Cholesterin in der Blasengalle mit dem Vorhandensein von Gallensteinen zu korrelieren und aus diesem Verhältnis einen "Cholesterinsättigungsindex" zu berechnen, bei dessen Überschreiten in der Galle Steine auftreten sollten.

Dennoch vergingen viele Jahre, bis erst Admirand und Small diesem Konzept zu allgemeiner Anerkennung verhelfen (2). Sie konnten zeigen, daß die Übersättigung der Galle mit Cholesterin die unabdingbare Voraussetzung zur Gallensteinentstehung ist. Übersättigte Galle besitzt nicht mehr die Fähigkeit, das enthaltene Cholesterin dauerhaft in Lösung zu halten. Nach einiger Zeit, in der sich die Galle im metastabilen Zustand befindet, fallen die ersten Kristalle aus. Das Entstehen dieser Cholesterinkristalle, auch genannt die Cholesterinnukleation, ist der erste Schritt zur Gallensteinbildung (191).

Damit war ein metabolischer Defekt, nämlich die abnormal hohe Cholesterinsekretion in Relation zu der Sekretion von Lezithin und Gallensalzen, in den Mittelpunkt des Verständnisses der Gallensteinentstehung gerückt (189,198,217,155,177,182,16).

In den darauffolgenden Jahren wurde diese Theorie sowohl bestärkt wie auch angegriffen. Es bestätigte sich, daß praktisch alle Blasengallen von Steinträgern mit Cholesterin übersättigt sind

(29) und daß sie fast immer Cholesterinkristalle enthalten (179,222). Bei vielen Krankheiten oder metabolischen Störungen, die mit einem gehäuften Auftreten von Cholesteringallensteinen verbunden waren, fand sich ein Defekt, der zu einer Übersättigung der Galle mit Cholesterin führte, entweder durch eine relative Hypersekretion von Cholesterin oder eine relative Hyposekretion von Gallensalzen in die Galle.

Carey teilte die der Gallensteinbildung zugrundeliegenden Störungen in sechs Gruppen ein (31):

Typ 1: defekte Gallensalzsynthese (z.B. bei der kongenitalen 12a-hydroxylase Defizienz (129), bei der cerebrotendinösen Xanthomatose (171), unter Östrogeneinfluß)

Typ 2: exzessiver Gallensalzverlust, der durch Neusynthese nicht mehr ausgeglichen werden kann (190,181,122) (z.B. bei Ileumresektionen (1,69), Erkrankungen des terminalen Ileum wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (36,43,8,64,)), Zystische Fibrose mit Pankreasinsuffizienz (167,220,221), primäre Gallensalzmalabsorption)

Typ 3: übersensitiver Gallensalz-Feedback Regulationsmechanismus (der zur Reduktion des Gallensalzpools bei einigen weißen Gallensteinträgern führt)(183,218,121,56,57)

Typ 4: relative Cholesterinhypersekretion (z.B. bei Fettsucht (12,110,56), diätbedingt (57,39,151,172,173), bei Hyperlipoproteinämie (3,4,5,45), bei Diabetes (14), unter Östrogen-(13,147,157,158,159) und Clofibrattherapie (10, 58), in der Schwangerschaft (160) und genetisch bedingt (213,214,215))

Typ 5: gemischter Defekt aus Typ 3+4 : verminderte Gallensalz-

und vermehrte Cholesterinsekretion (z.B. bei den Pima Indianern und einem Großteil der normalgewichtigen kaukasischen Gallensteinträgern) (17,55)

Typ 6: extrahepatische Erkrankungen der Gallenwege, die zu Abflußstörungen oder Gallenblasenentzündung führen (z.B. Cholecystitis, Salmonellose, parenterale Ernährung (163), Somatostatinom (93), Vagotomie, in der Schwangerschaft (114,22,149))

Aber schon wenige Jahre nach dem Erscheinen der Arbeit von Admirand und Small, auf Grund derer man geglaubt hatte, die Ursache der Gallensteinbildung nun zu kennen, stellten sich die ersten Widersprüche ein. Mehrere Forschergruppen stellten fest, daß in der ursprünglichen Arbeit die Übersättigungsgrenze für Nativgallen zu hoch angegeben war (65,131,72,88). Damit hatten auch ein Großteil der gesunden Normalpersonen eine mit Cholesterin übersättigte Galle, ohne jedoch Cholesterinkristalle oder Steine zu bilden (72,38,29,224,179). Die Überlappung der Cholesterinsättigungsindices in der Galle von Normalpersonen und Steinträgern war außerdem beträchtlich (38,72,134,192,25,54).

Die Frage, warum sich in übersättigter Galle von gesunden Kontrollpersonen wesentlich langsamer Cholesterinkristalle bilden als in ähnlich übersättigter Steintränergalle (179,71), wird seit über zehn Jahren von vielen Forschergruppen bearbeitet und ist auch Gegenstand dieser Arbeit.

In den folgenden Abschnitten soll eine Übersicht gegeben werden über die physikalisch-chemischen Grundlagen des Cholesterintransportes und der Cholesterinnukleation in der Galle aus heutiger Sicht.

Cholesterintransport und Cholesterinlöslichkeit in der menschlichen Galle:

Das unveresterte Cholesterin in der Galle ist in Wasser praktisch unlöslich (170,187). In der Galle wird es zum Teil in Form von gemischten Mizellen aus Gallensalzen, Lezithin und Cholesterin in Lösung gehalten und zum Teil in Form von unilamellären Vesikeln aus Lezithin und Cholesterin.

In den gemischten Mizellen wirken die stark polaren Gallensalze auf Grund ihrer Wirkung als Detergentien lösungsvermittelnd. Sie bilden in wässriger Lösung kleine Aggregate, genannt einfache Mizellen, sobald die "kritische mizellare Konzentration" des entsprechenden Gallensalzes in der wässrigen Phase erreicht ist. Die polaren Seiten haben Kontakt mit der wässrigen Phase, die hydrophoben Seiten sind im Inneren der Mizelle zueinander gekehrt. Das wasserunlösliche Cholesterin wird im hydrophoben Kern der Mizelle transportiert. Lezithin, ebenfalls relativ hydrophob, aber polarer als Cholesterin, wird auch in die gemischten Mizellen inkorporiert. Diese werden damit größer und haben eine wesentlich größere Fähigkeit, Cholesterin zu transportieren. Unser Wissen über die Größe, Form und Cholesterintransportfähigkeit der gemischten Mizelle in Kunstgallösungen in Abhängigkeit von molarem Verhältnis der Lipide zueinander, dem Gesamtlipidgehalt, der Temperatur und der Ionenkonzentration verdanken wir vor allem den umfangreichen Studien von Bourges, Small und Dervichian (20,184,185,186), Carey und Small (26,27,28,29) und später Mazer und Carey (115,116,117,118), die mittels quasi-elastischer Laser-Lichtstreuung solche mizellaren Systeme unter verschiedenen Bedingungen untersuchten. Sie erkannten, daß die Mizellengröße und -form stark abhängig ist von dem Lezithin/Gallensalzverhältnis, und nahmen an, daß bei den physiologischen Lezithin/Gallensalz-

verhältnissen in der Galle zwei Arten von Mizellen vorhanden sind: kleine einfache Gallensalzmizellen und größere gemischte Mizellen. Müller dagegen folgerte aus seinen mittels Röntgenfeinstrukturuntersuchungen gewonnenen Ergebnissen, daß immer nur eine Form von Mizelle vorliege, und zwar bei niedrigen Lezithin/Gallensalzverhältnissen eine kleinere sphärische, bei höheren Verhältnissen eine discoide Form mit weitaus größerer Cholesterintransportfähigkeit (130). Zu diesem Schluß kamen auch Holzbach und Claffey anhand ihrer Ergebnisse aus calorimetrischen Studien (35).

Lange Zeit glaubte man, daß die mizellare Form neben dem winzigen Anteil physikalisch gelösten Cholesterins die einzige Transportform des Cholesterins in der isotropen Galle sei. Isotrop nannte man damals eine Galle, wenn sie unter dem Lichtmikroskop homogen erschien, also keine Cholesterinkristalle irgendeiner Art zu finden waren. In den letzten Jahren fand sich jedoch eine weitere Transportform für Cholesterin in der Galle, und zwar die oben erwähnten Vesikel aus Lezithin und Cholesterin (194,92,61,212,53). Diese sind lichtmikroskopisch nur in aggregierter Form zu sehen. In frischer Nativgalle sind aber vor allem kleine unilamelläre Vesikel vorhanden, in einer Größenordnung von 400-1000 Å, wie durch Studien mit Laser-Lichtstreuung (118,194,53) und videoverstärkten Lichtmikroskopen (92,61) festgestellt wurde. Somit ist eine "isotrope" Galle nicht notwendigerweise homogen in Hinblick auf den Zustand des transportierten Cholesterins. Ob diese Vesikel nur in übersättigter oder auch in untersättigter Galle vorhanden sind, ist noch nicht bekannt. Die wichtige Konsequenz daraus wird in einem späteren Abschnitt diskutiert.

Wie man aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen weiß, sind diese Vesikel wahrscheinlich ähnlich aufgebaut wie künstlich herstellbare unilamelläre Phospholipid- Cholesterin Liposomen.

Der Aufbau ist dem der Zellmembranen ähnlich, im Innern des Liposoms befindet sich wässriges Medium, das von einem Lipid-Bilayer umgeben ist und so vom äußeren wässrigen Medium getrennt ist, solange das Lipidbilayer intakt ist. Das Cholesterin ist zwischen den hydrophoben Phospholipidbilayer-Innenschichten eingelagert. Die Eigenschaften solcher Liposomen machen sich seit etwa zwei Jahrzehnten Wissenschaftler aus den verschiedensten Gebieten zunutze. Deshalb sind viele Studien über die Beeinflussung der Eigenschaften solcher Liposomen durch verschiedene Substanzen wie Proteine, Polysaccharide, Ionen, und durch unterschiedliche Lipidzusammensetzung durchgeführt worden. Solche Substanzen sind auch in der Galle vorhanden und könnten die Eigenschaften der Lezithin-Cholesterinvesikel in unterschiedlicher Weise beeinflussen.

Die in der menschlichen Galle vorhandenen Vesikel haben eine enorme Cholesterintransportkapazität. Sie können bis zu Zweidritteln aus Cholesterin bestehen und stellen dabei eine relativ stabile Transportform des Cholesterins dar. Niedriger Gesamtlipidgehalt und hoher Lezithin- und Cholesterinanteil, zum Beispiel in hepatischer Galle, begünstigen ihr Vorhandensein (91,194,213). Man nimmt jetzt sogar an, daß das Cholesterin und Lezithin in vesikulärer Form aus der Leberzelle in die Galle ausgeschieden wird und erst dort auf Grund der Detergentienwirkung der Gallensalze in gemischten Mizellen gelöst wird. In der Lebergalle sind auf Grund ihrer niedrigen Gallensalzkonzentration noch viele Vesikel vorhanden (194,213). Wird die Galle konzentriert wie in der Gallenblase, so werden sie auf Grund der dabei steigenden Gallensalzkonzentration langsam in gemischte Mizellen umgewandelt. In übersättigter Blasengalle liegt aber immer noch ein Teil des Cholesterins in dieser Form vor, wie man jetzt aus Untersuchungen mit dem videoverstärkten Lichtmikroskop weiß (61,92).

Cholesterinübersättigung und Metastabilität:

Eine Galle wird als mit Cholesterin übersättigt bezeichnet, wenn der molare Anteil an Cholesterin im Gesamtlipidgehalt denjenigen Anteil übersteigt, der bei den gegebenen Bedingungen, vor allem Temperatur, Gesamtlipidgehalt und Lecithin/Gallensalzverhältnis, in mizellarer Form löslich ist. Der Cholesterinsättigungsindex ist definiert als der Quotient zwischen dem vorhandenen molaren Anteil des Cholesterins vom Gesamtlipidgewicht in einer Galle und dem bei den gegebenen Bedingungen in dieser Galle maximal löslichen Anteil (29,30). Die Sättigungsgrenze wurde durch die wegweisenden Arbeiten von Bourges, Small und Dervichian (20) und Admirand und Small (2) ermittelt und später durch Holzbach u.a. (72), Tamasue u.a. (203), Hegardt und Dam (65) und vor allem Carey und Small (29) mit verbesserten Techniken nochmal genau bestimmt. In diesen Studien fand sich, daß sowohl in Modell- wie auch in Nativgallen das Phänomen der Metastabilität auftritt. Innerhalb eines bestimmten Lipidkompositionsbereiches können Gallen zwar übersättigt sein, aber dennoch isotrop, d.h. man kann keine Kristalle finden (73). Dieser metastabile Bereich ist in Nativgallen aus unbekannten Gründen wesentlich größer als in Modellgallen (77).

Der metastabile Zustand der übersättigten Galle ist aber von begrenzter Dauer. Nach einer Zeitspanne, die als Nukleationszeit bezeichnet wird, entstehen die ersten Kristalle (71,179,191,224).

Lange suchte man den Grund für das Phänomen der Metastabilität, das besonders in Nativgallen so ausgeprägt war, daß herkömmliche physikalisch-chemische Erklärungen nicht ausreichten.

Mit wachsendem Wissen über die Vorgänge während des Nukleationsprozesses, die im folgenden Abschnitt erläutert werden, hat natürlich auch das Wissen über die Vorgänge zugenommen, die diesen Prozeß verzögern und also den metastabilen Zustand verlängern.

Cholesterinnukleation und Steinwachstum:

In der nativen Galle kann Cholesterin in sechs Formen vorliegen: der winzige Anteil physikalisch gelösten Cholesterins, das in mizellarer Form gelöst und das in kleinen unilamellären Vesikeln transportierte Cholesterin, die "liquid crystals", die wie die Vesikel aus Lecithin und Cholesterin bestehen, und die Cholesterinmonohydratkristalle. Ganz selten kann man "transitional forms" sehen, also Übergangsformen zwischen liquid crystals und Cholesterinmonohydratkristallen und ebenfalls selten nichtdoppelbrechende Vesikelaggregate. In der isotropen, d.h. lichtmikroskopisch homogenen Galle sind nur die ersten drei Formen vorhanden. Sind liquid crystals, Übergangsformen und Cholesterinmonohydratkristalle vorhanden, so hat die Galle nukleiert. Dabei unterscheidet man eine Nukleation von liquid crystals und eine von Cholesterinmonohydratkristallen. Die Nukleationszeit wird üblicherweise definiert durch die Zeitspanne bis zum Auftreten der ersten Cholesterinmonohydratkristalle (71).

Liquid crystals wurden in der menschlichen Galle erst in den siebziger Jahren entdeckt (141). Ihre Beschaffenheit wurde oft mit dem eines "oil droplet", Öltropfen, verglichen. Sie bestehen aus einem variablen Verhältnis aus Cholesterin und Lecithin, können konfluieren oder sich teilen, deshalb "liquid" crystals, haben ein definiertes Röntgendiffraktionsbild, deshalb als "crystals" bezeichnet, und treten nur in übersättigter Galle auf und nur vorübergehend während des Nukleationsprozesses. In letzter Zeit nimmt man an, daß diese liquid crystals durch die Fusion

von Vesikeln entstehen. Sie haben unter dem Polarisationsmikroskop ein typisches Aussehen, nämlich das eines runden sehr hellen Partikels mit einem schwarzen Kreuz in der Mitte.

Durch die Entdeckungen der letzten Jahre stellt man sich den Nukleationsprozeß in der nativen Galle heute folgendermaßen vor:

In der untersättigten Galle ist entweder alles Cholesterin in stabiler mizellarer Form gelöst oder es sind zwar noch Vesikel vorhanden, das in ihnen enthaltene Cholesterin kann aber in die untersättigten Mizellen aufgenommen werden. In der übersättigten Galle dagegen ist die mizellare Transportkapazität ausgelastet oder überlastet und ein Teil des Cholesterins liegt in vesikulärer Form vor. Diese zunächst kleinen unilamellären Vesikel konfluieren langsam zu multilamellären Liposomen (61,92,178), die ab einer bestimmten Größe im Lichtmikroskop als liquid crystals zu sehen sind, auch "Malteserkreuze" genannt wegen ihrer typischen Erscheinungsform unter dem Polarisationsmikroskop. Diese liquid crystals konfluieren und werden gleichzeitig mehr und mehr mit Cholesterin aufgesättigt. In den konfluerten liquid crystals entstehen dann häufig die ersten Cholesterinmonohydratkristalle.

Gleichzeitig mit dem Auftreten der ersten Cholesterinmonohydratkristalle verschwinden die liquid crystals relativ rasch (74,75). Denn erstere sind die energetisch günstigste Form. Sind erst einmal einige solcher Kristalle vorhanden, so kann eine heterogene Nukleation stattfinden, die viel weniger Energie zur Konformationsänderung des mizellar oder vesikulär gelösten Cholesterin in Monohydratkristalle braucht. Das gelöste Cholesterin kann dann ohne den zeitraubenden Schritt über die Entstehung von liquid crystals und deren Übersättigung mit Cholesterin direkt an die entstandenen Monohydratkristalle angelagert werden, die damit in alle Raumrichtungen zu wachsen beginnen. Der fertige Cholesterin-

monohydratkristall hat das Aussehen einer "window pane", Fensterscheibenglas, zarte Parallelogramme mit zum Teil angebrochenen Ecken, die häufig in Haufen aneinandergelagert sind (88).

Den oben beschriebenen Nukleationsprozeß, der über die Entstehung von liquid crystals abläuft, bezeichnet man als homogene Nukleation. Bei der heterogenen Nukleation ist wesentlich weniger Umwandlungsenergie des gelösten Cholesterins in die Monohydratkristalle erforderlich. Sie läuft deshalb bei niedrigeren Übersättigungsgraden und schneller ab als die homogene Nukleation. Sie hat das Vorhandensein von Nukleationskernen zur Voraussetzung. Dann kann sich das Cholesterin direkt an die Nukleationskerne anlagern und so ein Monohydratkristall entstehen.

Welche Substanzen in der Galle (außer den Monohydratkristallen selbst) als Nukleationskerne wirken, ist jetzt Gegenstand intensiver Forschung.

Das Auftreten von Cholesterinkristallen in der Galle ist unabdingbare Voraussetzung für die Entstehung von Cholesteringallensteinen. Diese bestehen nämlich zum größten Teil aus laminierten Cholesterinkristallen in einer organischen Matrix, die aus Mukopolysacchariden und Pigmenten zusammengesetzt ist (11,112, 142,226). Daneben werden auch Mineralsalze, vor allem Kalziumsalze, in den Stein inkorporiert. Durch radiales, konzentrisches oder unstrukturiertes Zusammenlagern von laminierten Cholesterinkristallen wächst der Stein (108). Dabei können die Cholesterinschichten auch mit Schichten aus Pigmenten und Kalziumsalzen abwechseln.

Nukleationsgeschwindigkeit:

In der homogenen Modellgalle sind die Faktoren, die die Geschwindigkeit und Art des Nukleationsprozesses bestimmen, weitgehend bekannt:

Einmal ist der Grad der Übersättigung maßgeblich, ausgedrückt als der Cholesterinsättigungsindex. Bei sonst konstanten Verhältnissen besteht eine lineare Korrelation zwischen dem Grad der Übersättigung und der Geschwindigkeit, mit der der Nukleationsprozeß abläuft (77).

Zum zweiten bestimmt der Gesamtlipidgehalt bei sonst konstanten Verhältnissen die Nukleationsgeschwindigkeit, allerdings nicht-linear (91). Der Gesamtlipidgehalt ist nämlich bei sonst konstanten Bedingungen wahrscheinlich ausschlaggebend für das Verhältnis mizellar gebundenes Cholesterin/vesikulär transportiertes Cholesterin. Bei gleichem Übersättigungsgrad hat eine Modellgalle mit einem hohen Anteil an vesikulär transportiertem Cholesterin eine längere Nukleationszeit als eine mit einem niedrigen Anteil. Die Vesikel sind, wie schon erwähnt, nämlich eine sehr stabile Transportform für Cholesterin in übersättigter Galle.

Drittens ist das Lezithin/Gallensalzverhältnis ein wichtiger Faktor im Nukleationsprozeß, weil es die Mizellengröße und -form maßgeblich beeinflußt sowie den Anteil an Cholesterin mitbestimmt, der in vesikulärer und liquid kristalliner Form vorliegt (20,29,116,130).

Ganz entscheidend für die Nukleationsgeschwindigkeit ist natürlich die Temperatur der Probe. Die maximale mizellare Cholesterintransportfähigkeit steigt in Modellgallen mit steigender Tem-

peratur (117). Auf der anderen Seite wird die Nukleationszeit in Modellgallen mit steigender Temperatur kürzer (224).

Nukleations- und Antinukleationsfaktoren in der menschlichen Galle:

Wie schon erwähnt, wurde vor einigen Jahren festgestellt, daß bei gleichem Übersättigungsgrad die Galle von Gallensteinträgern wesentlich schneller nukleiert als die von gesunden Normalpersonen (25,54,71,225). Weder die Lipidzusammensetzung noch die Lipidkonzentration war in beiden Kollektiven signifikant verschieden.

Deshalb suchte man nach Substanzen, die in der menschlichen Galle vorhanden sind und die Nukleation verzögern oder beschleunigen.

Die Gruppe um Holzbach suchte nach möglichen Inhibitoren der Nukleation in der Nativgalle. Als Kandidaten boten sich die biliären Proteine an, die etwa mit 5% des Feststoffgehaltes der Blasengalle nach den Lipiden die nächstgrößte Substanzgruppe sind (71). Tatsächlich kam es in Modellgallen zu einer Nukleationszeitverlängerung, wenn weitgehend delipidisierte Blasengalle von Normalpersonen zugesetzt wurde (77).

Die Gruppen um Mao in New York und LaRusso in Rochester hatten in der menschlichen Galle intakte Apoproteine gefunden (180). Apoproteine stabilisieren die Lipoproteine im Blut und können auch mit künstlichen Liposomen ähnlich der in der Galle vorhandenen Vesikel interagieren (59,33,87,95,137,201,202). Deshalb lag es nahe, die Wirkung gereinigter Apoproteine aus menschlichem Serum auf die Nukleationszeit einer Modellgalle zu untersuchen. Tatsächlich zeigte sich, daß die Apoproteine AI und AII die

Nukleationszeit verlängern (90).

Diese Apoproteine bilden im nicht denaturierten Zustand Helices, von denen die eine Seite hydrophil und die andere hydrophob ist (202). Durch Anlagerung nur einiger Apoproteinmoleküle an künstliche Liposomen kann deren Konformation verändert werden, und zwar nehmen die ursprünglich runden Liposomen eine discoide Form an (59,95,137), ähnlich der Konformation der nativen High-density Lipoproteine (62). Die Liposomen konfluieren in der neuen Konformation weniger leicht und sind damit stabiler. Auch die Membrandurchlässigkeit der Liposomen wird durch die Apoproteine verändert (59). Auf die Lipoproteine im Serum wirken die Apoproteine in ähnlicher Weise stabilisierend.

Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, daß die Apoproteine A I und A II stabilisierend wirken auf die Vesikel oder liquid crystals in der Nativgalle (90). Leider konnte kein Konzentrationsunterschied von Apoprotein AI und AII in der Galle von Normalpersonen und Gallensteinträgern gefunden werden (180). Bisher konnte auch noch keine Interaktion zwischen natürlichen oder künstlichen Gallevesikeln nachgewiesen werden. Man weiß, daß die Interaktion zwischen Apoprotein AI und künstlichen Phospholipidliposomen mit steigenden Cholesteringehalt im Lipidbilayer abnimmt und schließlich nicht mehr zustande kommt (59,150). Die Vesikel in der Galle haben wahrscheinlich einen sehr hohen Cholesteringehalt, was ihre Affinität für Apoproteine sehr einschränken könnte. Diese Fragen werden momentan intensiv bearbeitet und interessante Ergebnisse sind zu erwarten.

Es gibt in der Natur eine Reihe von Beispielen für die Antikristallisationswirkung von bestimmten Proteinen. Zum Beispiel gibt es in Eismeerfischen ein "anti-freeze-protein", das verhindert, daß ihr Körperwasser gefriert (47,40,41). Dabei lagern sich diese

Proteine an die für das Kristallwachstum wichtigen Stellen eines Mikrokristalls an und hemmen es so (154).

Auch im Menschen gibt es Antikristallisationsproteine, und zwar vor allem im Urin (86,135), aber es ist auch das Vorkommen von Substanzen in der menschlichen Galle beschrieben worden, die das Wachstum von Kalziumkristallen hemmen (197).

Damit gibt es zwei Hypothesen über die Wirkung von Proteinen in der Galle, die die Nukleation von Cholesterin hemmen:

Proteine können mit den Vesikeln interagieren, ihre Fusion und so auch die Nukleation verzögern. Beispiele für eine solche Wirkung von Proteinen auf künstliche Vesikel bieten die Wirkung der Apoproteine (59,95,137,33) und eine ganze Reihe weiterer Membranproteine (200,,144,138,46,34,111).

Proteine können aber auch direkt das Kristallwachstum verhindern, indem sie sterisch wichtige Positionen im Kristall besetzen und so das Wachstum hemmen (154).

Auf diesem Gebiet ist intensive Forschung weiter im Gang und neue wichtige Ergebnisse sind zu erwarten.

Andere Gruppen untersuchten das Vorhandensein von Nukleationsfaktoren in der Galle. Schon in den sechziger Jahren fand Bouchier mit seiner Gruppe höhere Konzentrationen von Hexosamin als Maß für den Schleimgehalt in Blasengallen von Cholesterinsteinträgern als von Normalpersonen (18). Später untersuchten er und die Gruppen von LaMont, Wahlin, denBesten und Schoenfield die Rolle von Gallenblasenmuzin in der Pathogenese von Cholesterinsteinen

im Tiermodell (51,101,42,228,220). Dabei zeigte sich, daß im Präriehund nach Beginn der Cholesterinfütterung der Muzingehalt in der Blasengalle stark ansteigt, und zwar gleichzeitig mit dem Übersättigtwerden der Galle und vor der Entstehung der Steine. Dieser Anstieg der Muzinkonzentration wird über Prostaglandine (97,98,228) vermittelt und kann durch die Gabe von Aspirin verhindert werden (102). Damit wird im Präriehund auch die Entwicklung von Gallensteinen unterbunden. Inwieweit sich diese Ergebnisse auf die menschliche Gallensteinentstehung übertragen lassen, ist unklar, und wird im Diskussionsteil eingehender erörtert.

Auch menschliches Gallenblasenmucin beschleunigt die Cholesterinkristallisation in Modellgallen (105). Wieweit dies bei der Entstehung menschlicher Gallensteine von Wichtigkeit ist, und ob und warum es im Menschen zu einer Muzinhypersekretion vor Entstehung eines Gallensteines kommt, ist unbekannt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine Muzinhypersekretion im Menschen die Bildung von "sludge" aus Muzinen und Cholesterinkristallen in der Gallenblase bewirkt und daß dieser Sludge die Vorstufe zur Cholesterinsteinentwicklung darstellt.

Während die nukleationsbeschleunigende Wirkung von Gallenblasenmucin wahrscheinlich auf der Ermöglichung von heterogener Nukleation durch die großen hydrophoben Muzinpolymere beruht (19), sind wahrscheinlich auch Faktoren in der Nativgalle von Wichtigkeit, die die homogene Nukleation beschleunigen. Untersuchungen mit dem videoverstärkten Mikroskop haben nämlich gezeigt, daß die Fusion von kleinen Vesikeln zu Aggregaten und dann liquid crystals und Cholesterinmonhydratkristallen, die die homogene Nukleation charakterisiert, in der Blasengalle von Steinträgern beschleunigt abläuft (61).

Die Fusion von künstlich erzeugten Liposomen kann durch Einbau einer Reihe von Proteinen (144,164,138,199) und Polysacchariden (120,176) beschleunigt werden, aber auch durch die Anwesenheit von Kalziumionen (139,79). Interessant sind in diesem Zusammenhang die Studien von Kibe u.a. und von der Gruppe um Strasberg (91,25). Kibe konnte zeigen, daß die Cholesterinkristallisation durch Anwesenheit von Kalziumionen in Modellgallen beschleunigt wird, aber nur in solchen mit niedrigem Gesamtlipidgehalt (91). In diesen Gallen sind viele Vesikel vorhanden. Zwischen der Kalziumkonzentration in Gallen von Steinträgern und Normalpersonen wurde bis jetzt aber kein signifikanter Unterschied gefunden (71,54). Wieweit in diesem Zusammenhang die Interaktion zwischen Gallensalzen und Kalziumionen eine Rolle spielt, ist noch nicht bekannt (123,124,125,153). Gallensalze binden Kalziumionen (123,124,153) und könnten damit das Ausfallen von Kalziumsalzen aus der Gallenlösung verhindern, die wiederum als Nukleationskerne wirken könnten.

Strasberg's Gruppe fand Hinweise für einen starken nukleationsfördernden Faktor in der Blasengalle von Cholesterinsteinträgern (25). Gefilterte Mischungen aus Steinträger- und Normalgalle hatten nämlich wesentlich kürzere Nukleationszeiten als die Normalgallen, viele genauso kurze wie die Steinträgergallen. Die Porengröße der Molekularsievefilter war so klein, daß nach ihren Berechnungen die Muzinpolymere das Filter nicht passieren konnten. Erhitzen der Steinträgergalle über längere Zeit auf Siedetemperatur beseitigte den nukleationsfördernden Effekt. Über die Natur dieses Faktors ist noch nichts näheres bekannt.

Fragestellung:

Unsere Kenntnisse der physikalisch-chemischen Grundlagen des Cholesterintransportes und der Cholesterinnukleation in der menschlichen Galle leiten sich hauptsächlich von Untersuchungen an Modellgallen ab. Diese Modellgallen werden aus hochgereinigten Lipiden, meist Lecithin, Cholesterin und Natriumtaurocholat, manchmal auch einem Gallensalzgemisch, und einer gepufferten Elektrolytlösung hergestellt. Obwohl sich durch Untersuchungen an diesen Modellsystemen erst unser Verständnis der Cholesterin-übersättigung und -kristallisation entwickelte, können nicht alle in der menschlichen Galle auftretenden Phänomene im Modellsystem nachvollzogen werden. So hat zum Beispiel übersättigte Blasen-galle von Nichtsteinträgern oft eine wesentliche längere Nuklea-tionszeit und damit metastabile Phase als eine Modellgalle glei-chen Übersättigungsgrades (77). Blasengallen von Cholesterin-steinträgern dagegen haben oft eine kürzere Nukleationszeit als vergleichbare Modellgallen.

Dieses unterschiedliche Verhalten von Nativ- und Modellgalle gleichen Übersättigungsgrades könnte auf zwei grundsätzlichen Unterschieden beider Systeme beruhen:

1. Modellgallen werden durch Kopräzipitation gereinigter Lipide aus organischen Lösungsmitteln, Lyophilisation und nachfolgender Inkubation der Lipide mit dem geeigneten Puffer bei Temperaturen von 50-90°C über Stunden bis Tage hergestellt. Dabei werden je nach Lipidzusammensetzung rein mizellare Lösungen erhalten oder solche mit einer mizellaren und einer kristallinen Phase, wobei letztere aus "liquid crystals", Cholesterinmonohydratkristallen oder beiden bestehen kann. Seit kurzem weiss man, daß auch in

Kunstgallen unter bestimmten Bedingungen unilamelläre Vesikel auftreten (117,178).

In Modellgallen sind die Bedingungen für das Auftreten der verschiedenen Transportformen von Cholesterin bekannt und können reproduziert werden. Es ist dagegen noch nicht genau bekannt, in welcher Transportform das Cholesterin von der Leberzelle in die Galle sezerniert wird. Auf Grund neuester Untersuchungen nimmt man jetzt an, daß Cholesterin und Lecithin möglicherweise in Vesikelform in die Canaliculi ausgeschieden wird und diese durch die Detergenswirkung der Gallensalze in Mizellen umgewandelt werden, besonders während des Konzentrationsvorgangs in der Gallenblase. Damit kann in der Nativgalle bei Probengewinnung ein ganz unterschiedliches Verhältnis von Vesikeln zu Mizellen vorliegen als in einer ähnlich übersättigten Modellgalle. Da Vesikel eine sehr stabile Transportform von Cholesterin darstellen, könnte ein unterschiedliches Verhältnis von mizellarer und vesikulärer Transportform ein unterschiedliches Nukleationsverhalten von Nativ- und Modellgalle erklären.

2. In der Nativgalle sind außer den Lipiden, die den Hauptanteil der biliären Trockenmasse mit über 90% ausmachen, zahlreiche andere organische und anorganische Substanzen vorhanden. Dazu gehören zahlreiche anorganische Salze, hauptsächlich Natrium- und Kalziumchlorid, Pigmente wie z. B. unkonjugiertes und mono- und dikongugiertes Bilirubin, Spurenelemente und mit etwa 5% die biliären Proteine (71,54). Solche Nichtlipid-Substanzen könnten ebenfalls den Nukleationsvorgang in der Nativgalle beeinflussen und dabei fördernd oder hemmend auf den Kristallisationsvorgang einwirken.

Gegenstand dieser Arbeit ist das unterschiedliche Nukleationsverhalten von Steinträger- und Normalgalle. Wie schon in der Einleitung erwähnt, gibt es Hinweise für das Vorhandensein sowohl von Nukleations- wie auch Antinukleationsfaktoren in der Normalgalle (25,77,90,91,105). Weder ihre Natur noch ihr Wirkungsmechanismus konnte bisher geklärt werden. Es liegen Hinweise vor, daß bestimmte biliäre Proteine als Antinukleationsfaktoren wirken könnten (77,90) und daß menschliches Gallenblasenmucin in hohen Konzentrationen die Cholesterinnukleation beschleunigt (105).

Die beschriebenen Experimente hatten folgende Zielsetzungen:

- die Bearbeitung der Frage, ob die wesentlich kürzeren Nukleationszeiten der Steinträgergallen im Vergleich zu ähnlich übersättigten Normalgallen nur auf einem zum Zeitpunkt der Nukleationszeitbestimmung unterschiedlichen Verhältnis der verschiedenen Cholesterintransportformen Mizellen, Vesikel, "liquid crystals" und Cholesterinmonohydratkristalle bestehen
- oder ob ein Nichtlipid-Substrat in der Steinträgergalle vorhanden ist, daß die Nukleationszeit verkürzt, entweder indem eine weniger Aktivierungsenergie benötigende heterogene Nukleation stattfindet oder indem der Fusionsprozeß der Vesikel und "liquid crystals" beschleunigt wird
- oder ob ein Antinukleationsprotein in der Normalgalle die Nukleationszeit verlängert und dieses Protein in der Steinträgergalle fehlt oder in zu geringen Konzentrationen vorhanden ist.
- oder ob eine Kombination der drei Möglichkeiten vorliegt.

Dabei wurde besonders die Rolle der biliären Proteine im Nukleationsprozeß untersucht.

Um diesen Einfluß zu untersuchen, müssen die Proteine notwendigerweise von den biliären Lipiden getrennt werden, deren Konzentration und Verhältnis zueinander den Übersättigungsgrad und den Gesamtlipidgehalt bestimmen und damit als wichtigster Faktor die Nukleationszeit beeinflussen. Nur in Modellgallen mit genau berechnetem CSI und Gesamtlipidgehalt kann der Einfluß zusätzlicher Faktoren auf die Nukleationszeit zuverlässig bestimmt werden.

Nachdem die biliäre Lipidkonzentration einen 20-100fachen Exzeß gegenüber der Proteinkonzentration aufweist, wurde eine vollständige Delipidisierung der Proteine bisher nur entweder unter denaturierenden Bedingungen erreicht oder unvollständig und mit schlechter Ausbeute.

Für die Isolierung von Proteinen aus biologischen Membranen und Lipoproteinen wurden eine Anzahl von Delipidisierungstechniken unter Verwendung verschiedener organischer Lösungsmittel und Detergentien angewandt (66,67,24,99,128,140,174). Bei der Isolierung der möglichen Nukleations- und Antinukleationsproteine aus der Galle stellen sich zwei neuartige Probleme, die in dieser Form noch nie bearbeitet wurden.

Erstens ist das Protein/Lipid Verhältnis sehr niedrig, vergleichbar nur mit dem der VLDL-Lipoproteine und der Chylomikronen. Im Gegensatz zu diesen ist der Hauptanteil der Gallenlipide aber wesentlich polarer und damit mit herkömmlichen Delipidisierungsverfahren sehr schwer von den Proteinen zu trennen.

Zweitens müssen in diesem Fall nicht ein oder mehrere bekannte Proteine gewonnen werden sondern möglichst alle Gallenproteine,

da bis jetzt nicht bekannt ist, welche Gallenproteine Nukleations- und Antinukleationsproteine sind. Nachdem die biliären Proteine eine Vielzahl verschiedener Proteine mit unterschiedlichsten Eigenschaften wie Größe, pK, Löslichkeit usw. darstellen, ist die Erarbeitung eines Delipidisierungsverfahren mit hoher Ausbeute aller Gallenproteine ein schwieriges und bisher nicht gelungenes Unterfangen.

Material und Methoden:

Probengewinnung und Aufbewahrung:

Frische menschliche Blasengalle wurde unter sterilen Kautelen durch Punktion der Gallenblase während bauchchirurgischen Eingriffen gewonnen. Dabei wurde besonders auf vollständige Entleerung der Gallenblase geachtet sowie auf das Vermeiden von Blutbeimischung. Blasengalle von Organspendern wurde zur Zeit der Organentnahme vom hirntoten aber kreislaufstabilen Spender gewonnen. Frische Lebergalle wurde postoperativ durch T-Drainage gewonnen. Die Zustimmung zu dem experimentellen Protokoll wurde vom Clinical Research Projects and Institutional Review Committee erteilt.

Die Einteilung der Patienten in Cholesterinsteinträger, Pigmentsteinträger, Normalpersonen und Patienten mit Cholecystitis erfolgte unter Berücksichtigung der Anamnese, der Steinuntersuchung, der Gallenuntersuchung und des histologischen Gallenblasenbefundes (71,72). Dabei wurden Patienten mit Gallensteinleiden in der Anamnese aber zum Zeitpunkt der Lebergallengewinnung entfernter Gallenblase nicht in die Statistik aufgenommen. Als Normalkollektiv wurden Patienten genommen, die keine Steinbeschwerden in der Anamnese hatten (bei Organspendern nicht prüfbar), keine pathologischen Veränderungen der Gallenblasenwand (bei den meisten Normalpersonen und Organspendern nicht prüfbar, weil die Gallenblase nicht entfernt wurde), keine Cholesterinkristalle in der Galle zum Zeitpunkt der Probengewinnung und keine Steine irgendwelcher Art in der Gallenblase sowie keine "weiße Galle".

Unmittelbar nach der Probengewinnung wurden alle Gallen auf Blutbeimischung untersucht (mittels Hämoccult-test) und bluttingierte Gallen wurden verworfen. Ebenfalls wurde unter sterilen Bedingungen eine Kultur auf Aerobier und Anaerobier angelegt. Eine zytologische Untersuchung wurde bei einem Großteil der Gallen durchgeführt im Rahmen des Projektes zur proteolytischen Aktivität in der Blasengalle von Stein- und Nichtsteinträgern. Dazu wurde mit der Zytozentrifuge das zelluläre Material in der Galle auf Objektträger gebracht, fixiert und mit der Pappenheimfärbung und der Hämatoxylin-Eosinfärbung und der Gramfärbung untersucht. Die zellulären Bestandteile wurden in Mucosaepithelzellen, Leukozyten und Bakterien unterschieden.

Nach der Probenuntersuchung wurden alle Gallen entweder in den darauffolgenden Stunden verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Chemische Analysen:

Vor und nach der Delipidisierung wurden in allen Proben die Hauptbestandteile gemessen, und zwar Cholesterin, Lecithin, Gallensalze, Protein, Gesamtbilirubin und nicht-dialysierbare Kohlenhydrate als Bestimmung des Glycoproteinanteils. Außerdem wurde die Trockenmasse jeder Probe bestimmt.

Cholesterin wurde im enzymatischen Assay nach Allain bestimmt (6). Die Bestimmung erfolgt durch die Umwandlung von freiem Cholesterin in d-4-Cholestenon und H_2O_2 . Die Reaktion wird von der Cholesterinoxidase katalysiert und erfolgt unter Sauerstoffverbrauch. Durch die Katalase wird das freigesetzte Wasserstoffperoxid mit Methanol zu Formaldehyd und Wasser umgesetzt. Das

Formaldehyd bildet mit Ammoniumionen und Azetylazeton den gelben Farbstoff 3,5-diazetyl 1,4-dihydrolutidin, dessen Intensität bei 405 nm spektralphotometrisch bestimmt wird.

Die Phospholipidkonzentrationen in Nativ- und Modellgallen wurden zu Beginn der Arbeit durch Bestimmung des anorganischen Phosphors nach Bartlett (9) bzw. Fiske-Subbarow (48) gemessen. Nach Überprüfung der Vergleichbarkeit der gemessenen Werte wurde im Laufe der Arbeit zunehmend ein enzymatischer Assay, der von Gurantz u.a. beschrieben wurde (60), verwendet. Dieser Assay zeichnete sich besonders durch bessere Reproduzierbarkeit aus, nachteilig waren die hohen Kosten. Die Phospholipidbestimmung erfolgt durch Freisetzung von Cholin aus Lecithin, Lysolecithin und Spingomyelin durch die Phospholipase D aus *Streptomyces* Spezies. Das freigesetzte Cholin wird anschließend durch eine Cholinoxidase aus *Arthrobacter* Spezies zu Wasserstoffperoxid und Betain umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid in Anwesenheit einer Peroxidase aus Meerrettich ist zur Bildung eines roten Quinonfarbstoffes aus 4-Aminoantipyrin und Phenol erforderlich. Dieser Farbstoff wird spektrophotometrisch bei 500 nm quantifiziert.

Die Gesamtgallensäurekonzentration wurde mit dem 3 α -hydroxysteroid-Dehydrogenase-Assay bestimmt, und zwar nach der optimierten Methode von Turley und Dietschy (209). Das Prinzip des Assays beruht auf der Umwandlung der 3 α -Hydroxygruppe der Gallensalze in eine Ketogruppe durch die NAD⁺-abhängige 3 α -hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *Pseudomonas testosteroni*. Dabei wird das entstehende NADH spektrophotometrisch bestimmt.

Alle zur Lipidbestimmung verwendeten Proben wurden deproteiniert, und zwar bei der Bestimmung von Cholesterin und Gallensäuren durch Fällung der Proteine in Methanol, bei der Bestimmung von Phospholipiden durch Fällung mit Isopropanol, da Methanol in

dem Assay zu Fehlbestimmungen führt.

Alle Bestimmungen wurden in Probenduplikaten oder Triplikaten durchgeführt mit einem Leerwert für jede Probe zur Vermeidung von Interferenzen durch die Gallenpigmente.

Die Gallenproteine wurden fluorometrisch bestimmt nach einer Modifikation der Methode von Udenfriend und anderen (211,32). Dabei reagiert die selbst nicht fluoreszierende Substanz Fluorescamin mit primären Aminstrukturen zu einem stark fluoreszierenden Komplex. Die Proteine werden mittels alkalischer Hydrolyse in Aminosäuren übergeführt, die dann bei Raumtemperatur und pH 8.5 in wässriger Lösung mit dem Fluorescamin spontan reagieren. Mit dem Fluorometer wird die der Anzahl der primären Aminbindungen proportionale Fluoreszenz gemessen. Gallensalze interferieren im direkten Assay ohne Hydrolyse nicht, im indirekten werden sie vor der alkalischen Hydrolyse durch zweimalige Äthanol/Äther Extraktion zusammen mit dem Hauptteil der Pigmente entfernt, restliche Pigmente werden während der alkalischen Hydrolyse degradiert. Die Methode wurde durch Aminosäurenanalyse überprüft und standardisiert. Alle Messungen wurden in Triplikaten von jeder Probe durchgeführt.

Das Gesamtbilirubin wurde nach dem von Ehrlich 1883 entwickelten Konzept in einem von Evelyn und Malloy (113) modifizierten Assay bestimmt, der auf der Umwandlung von Bilirubin zu Azobilirubin durch diazotierte sulfanilischer Säure beruht. Proteingebundenes Bilirubin wird durch Fällung der Protein mit Methanol freigesetzt. Gemessen wird der entstehende lila Farbstoff bei 560 nm.

Die nicht-dialysierbaren Hexosen wurden in modifizierter Form nach dem von Roe und später Spiro beschriebenen Prinzip bestimmt (195). Dabei reagieren neutrale Zucker mit konzentrierter schwef-

liger Säure zu Furfuralderivaten, die wiederum mit Anthron einen blaugrünen Farbstoff ergeben, der bei 620 nm spektrophotometrisch gemessen wird.

Je 3 x 200 μ l Nativgalle wurde in kleinste Dialyseschläuche pipettiert und unter Zugabe von den Proteinasehemmern PMSF, EDTA und ϵ -Aminocaprönsäure zum Puffer 48 Stunden lang mit 4 Pufferwechseln gegen Hepes/Kochsalzpuffer (unten beschrieben) dialysiert, zum Schluß für einige Stunden gegen destilliertes Wasser. Die Säckchen wurden anschließend mit zweimaligem Nachwaschen in Reagenzgläser entleert und lyophilisiert. Nach Austesten des optimalen Konzentrationsbereiches wurde 5ml dest. Wasser zu jedem Reagenzglas gegeben. Je 1 Milliliter der gut gemischten Lösung wurde in drei Reagenzgläser pipettiert. Zwei davon wurden 5ml der abgekühlten Reaktionsmischung mit Anthron zugesetzt, in das dritte 5ml einer Reaktionsmischung ohne Anthron, um die unspezifische Farbentwicklung der vorhandenen Gallenproteine zu erfassen. Anschließend wurden die Reagenzgläser 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt, 20 min abgekühlt und die Farbentwicklung bei 620 nm gemessen. Als Standard wurden Galaktoselösungen eingesetzt mit Galaktosekonzentrationen von 25-300 μ g/ml, dem optimalen Meßbereich entsprechend.

Die Gesamttrockenmasse der Nativgallen wurde in winzigen Metallschälchen nach völliger Trocknung von 20 μ l Galle bei 60-70°C bestimmt. Dabei wurde auf einer Präzisionswaage das Gewicht der Schälchen vor und nach Zugabe und Trocknung der Galle gemessen.

Zur Bestimmung der Proteinaseaktivität in der Nativgalle wurde der von Varani u.a. beschriebene Assay durchgeführt (216), der auf der Spaltung von radioaktiv markiertem Kasein durch die zu bestimmenden Proteinase beruht.

Gelelektrophorese:

Die SDS (sodium dodecylsulfate)- PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) wurde in einem Apparat ähnlich dem von Reid und Bielecki (156) beschriebenen durchgeführt, in dem die Gele vertikal laufen. Als Puffersystem wurde das von Laemmli beschriebene verwendet (96). Die Proteine wurden meist auf 7-20% Gradientengel aufgetrennt, sowohl unter reduzierenden wie nicht reduzierenden Bedingungen. Mercaptoäthanol wurde als Reduktionsmittel verwendet. Die Proteine wurden bei 30 mA konstanter Stromstärke aufgetrennt. Fixiert wurde in 14% Methanol und 10% Essigsäure über Nacht, anschließend wurden die Proteinbanden durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurde die von Merril beschriebene Technik verwendet (119). Als Standard wurden gereinigte Proteinstandards von der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey, eingesetzt.

Delipidisierungsverfahren:

Neu entwickelte Butanolextraktions/Diafiltrationstechnik

Alle Schritte wurden bei 0-4°C ausgeführt. Eine abgemessene Menge Galle wurde in ein konisches Glasreagenzglas pipettiert und N-Butanol im Verhältnis 1:2 Butanol/Galle (V/V) wurde langsam an der Seite der Gefäßwand dazugegeben. Die Probe wurde zwei Minuten lang mit dem Vortexrührer gemischt und anschließend bei 20 000 g 20 min zentrifugiert. Die klare wässrige Phase im unteren Teil des Reagenzglases wurde aspiriert, ihr Volumen bestimmt und die

Extraktion wiederholt. Die wässrige Phase wurde anschließend in eine Amicon MMC Kammer (Amicon Corp. Denver, Mass.) pipettiert, falls mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet wurden, oder in eine Standard- Ultrafiltrationskammer mit Rührer (MicroFiltrationSystems, Sierra Court Dublin, CA) und Reservoir (Amicon Corp.), falls nur eine Probe delipidisiert wurde. Jede Kammer war mit einer YM5 Membran (Amicon Corp.) versehen. Die Kammer wurde unter 40 ppsm Druck gesetzt und das zehnfache Volumen der Originalprobe wurde als Hepes/Kochsalzpuffer (0.15M NaCl, 10mM Hepes, pH 7,5) zum Waschen der Probe verwendet. Nach Beendigung der Diafiltration wurde die Probe lyophilisiert und mit destilliertem Wasser auf das ursprünglich eingesetzte Volumen der Nativgalle aufgefüllt. Aliquots der delipidisierten Proteine wurden auf SDS-PAGE-Gradientengelen aufgetrennt.

Delipidisierung mit Detergens Octylglucopyranosid:

Eine Modifikation der von Helenius u.a. beschriebenen Technik wurde verwendet (67). Die Blasengallen wurden 3 Tage lang unter fließendem Leitungswasser dialysiert (Spectrapor 2, Spectrum Medical, Los Angeles, CA). Octylglucopyranosid (Sigma chemical Co.) wurde der dialysierten Galle zugesetzt zu einer resultierenden Konzentration von 100mM, ungefähr im vierfachen Überschuß zu den Phospholipiden. Dieses Gemisch wurde 20-24 Stunden lang unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Vier ml dieser Mischung wurde über 36 ml einer 25%igen Sucroselösung (25% Sucrose, 140mM NaCl, 10 mM Hepes, 30 mM Octylglucosid, pH 7.5) in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, Dieses wurde versiegelt und bei 37°C und 200 000 g 18 Stunden lang zentrifugiert. Die Lipide befanden sich anschließend im oberen Drittel des Röhrchen und ein Teil der Proteine in den

unteren zwei Drittel. Diese wurden durch Austropfen des Röhrchen von unten entfernt und zwei Tage lang in Hepes/Kochsalz Puffer dialysiert (vier Pufferwechsel). Anschließend wurden die Proben mit PEG-8000 (Fisher Scientific Co.) auf das Ausgangsvolumen konzentriert.

Delipidisierung mittels Äther/Äthanol Extraktion:

Es wurde eine Modifikation der von Brown u.a. für Lipoproteine beschriebenen Methode verwendet (24). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Lyophilisierte native und dialysierte (drei Tage lang mit acht Pufferwechseln von Hepes/Kochsalz Puffer) Galle wurde in einer Diäthyläther/ Äthanol (beide zweimal destilliert)-Mischung (3:1 Äther/Äthanol) in einem Verhältnis 1:20 Ausgangsvolumen der Galle/organisches Lösungsmittel fein dispergiert und 16 Stunden lang geschüttelt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 20000 g wurde der Überstand abgegossen und das Sediment nochmals mit den eben beschriebenen Schritten extrahiert. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit reinem Äther gewaschen und unter Stickstoff getrocknet. Reste von organischem Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt. Die delipidierte Probe wurde in Hepes/Kochsalz Puffer dispergiert und die Lipid- und Proteinkonzentration bestimmt.

Nukleationsstudien:

Modellgallenherstellung:

Die Herstellung der Modellgallen erfolgte nach dem von Carey und Small beschriebenen Protokoll (29).

Zur Herstellung der Stocklösungen wurden entweder hochgereinigte Lipide gekauft oder die Lipide so rein wie möglich erworben und weiter aufgereinigt. Cholesterin wurde von der Firma Eastman Kodak hochgereinigt erworben (Primary Standard, 99.5% minimum by DCS, X909 Eastman Kodak Co. Molekulargewicht 386.66), Eilezithin von der Firma Lipid Products (egg lecithin, grade I, Lipid Products, Surrey, England, Molekulargewicht 765), Natriumtaurocholat wurde von der Firma CalBiochem-Behring erworben (sodium taurocholate, A grade, CalBiochem-Behring, La Jolla, CA) und zweimal nach der Methode von Pope rekristallisiert (148). Dazu wurde das Natriumtaurocholat in 90%igem zweimal destilliertem Äthylalkohol gelöst, und zwar in 8ml Alkohol je 1g Natriumtaurocholat. Diese Lösung wurde zur Entfernung fester Bestandteile zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Zu diesem Überstand wurde unter Rühren vorsichtig zweimal destillierter Äther zugesetzt, bis Kristalle aus der Lösung ausfallen. Danach wurde das Gemisch über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurde in der Kälte das Gemisch über einen Buchner-Trichter mit einem Whatman 43 Filterpapier gegeben, das kristalline Natriumtaurocholat mit kleinem Mengen von Äther nachgewaschen und mittels einer Wasserstrahlpumpe und einer Vakuumflasche, deren Öffnung mit einem Gummistopfen mit Loch verschlossen ist, getrocknet. Durch dieses Loch wurde der Trichterhals luftdicht in die Flasche geführt und mittels Sog das Taurocholat getrocknet. Ätherreste wurden durch Lyophilisation des Salzes entfernt. Dann wurde das Verfahren

nochmal wiederholt. Die Ausbeute lag bei 70% des eingesetzten Salzes.

Aus allen Lipiden wurden Stocklösungen hergestellt, und zwar wurde 100mg Natriumtaurocholat pro Milliliter Methanol gelöst und die genaue Konzentration der Stocklösung im Assay bestimmt. Das Lezithin war bereits beim Kauf in Chloroform/Methanol gelöst und die genaue Konzentration wurde im Assay bestimmt. Fünfzehn Milligramm Cholesterin wurden pro ml Äthanol gelöst und die genaue Konzentration im Assay bestimmt. Alle Stocklösungen wurden unter Stickstoff mit Teflonkappen fest verschlossen und mit Teflonband versiegelt im Dunkeln aufbewahrt, das Lezithin bei 4°C.

Alle verwendeten organischen Lösungsmittel waren zweimal destilliert. Zur Herstellung einer Modellgalle mit bestimmtem Gesamtlipidgehalt und Cholesterinsättigungsindex wurde die entsprechende Menge jedes Lipides berechnet.

Als Erläuterung soll ein Beispiel gerechnet werden.

Eine Modellgalle mit einem CSI von 1.42, einem Gesamtlipidgehalt von 80g/L, 9.6 Molprozent Cholesterin und einem Gallensalz/Phospholipid Verhältnis von 2.33 soll hergestellt werden. Wieviel Milliliter jeder Stocklösung muß zur Herstellung von einem Milliliter Modellgalle verwendet werden.

Abkürzungen: XOL=Cholesterin, BA=Gallensalz, PL=Lecithin

$$1.) \quad \frac{100 \cdot \text{XOL}}{\text{XOL} + \text{BA} + \text{PL}} = 9.6 \quad \text{nach XOL auflösen!}$$

$$9.6 \text{ XOL} + 9.6 \text{ BA} + 9.6 \text{ PL} = 100 \text{ XOL} \quad / - 9.6 \text{ XOL}$$

$$9.6 (BA + PL) = 90.4 \text{ XOL}$$

gegeben: $BA/PL = 2.33$ / * PL, in l.) einsetzen

$$9.6 (2.33 PL + PL) = 90.4 \text{ XOL} \quad \text{Dies sind molare Verhältnisse!}$$

$$31.97 \text{ PL} = 90.4 \text{ XOL}$$

$$PL = 2.83 \text{ XOL}$$

$$BA = 2.33 (2.83 \text{ XOL }) = 6.59 \text{ XOL}$$

Die Gesamtlipidkonzentration ist 80 g/L, d.h. die Konzentrationen in g/L von Cholesterin, Gallensalzen und Lecithin zusammen sollen 80g/L ergeben.

Oben sind aber die molaren Verhältnisse berechnet worden!

Also:

$$387 \text{ Xol} + 538 \text{ BA} + 765 \text{ PL} = 80\text{g/L}$$

jetzt die molaren Verhältnisse einsetzen!

$$387 \text{ g/mol XOL} + 538 \text{ g/mol (6.59 XOL)} + 765 \text{ g/mol (2.83 XOL)}$$

$$= 80\text{g/L}$$

$$6097.37 \text{ g/mol XOL} = 80\text{g/L}$$

$$\text{XOL} = 0.01312 \text{ mol/L}$$

$$\text{XOL} = 13.12 \text{ mmol/L}$$

$$PL = 2.83 \text{ (13.12mmol/L)}$$

$$BA = 6.59 \text{ (13.12mmol/L)}$$

Wieviel Milligramm pro Milliliter Modellgalle müssen von jedem Lipid zugesetzt werden?

Cholesterin:

$$387 \text{ mg/mmol} * 13.12 \text{ mmol/L} = \frac{387 * 13.12}{1000} \text{ mg/ml}$$

$$= 5.07 \text{ mg/ml}$$

Nehmen wir an, die Stocklösung hat eine Konzentration von 15 mg/ml Cholesterin.

Also:

$$\frac{5.07}{15} = 0.338 \text{ ml}$$

Es müssen 0.338 ml der Cholesterinstocklösung zur Herstellung von einem Milliliter der gewünschten Kunstgalle verwendet werden.

Entsprechend wird die benötigte Menge der anderen Stocklösungen berechnet.

Als Gefäße zur Modellgallenherstellung wurden konisch nach unten zulaufende kratzerfreie und mit Chromsäure und bidestilliertem Wasser gründlich gereinigte Glasgefäße verwendet. Als erstes wurde mit einer Hamiltonpipette exakt die benötigte Menge an Lezithinstocklösung in das Gefäß pipettiert und das organische Lösungsmittel bei 55°C unter Stickstoff abgedampft. Danach wurde die benötigte Menge Cholesterinstocklösung zugegeben und wieder das Lösungsmittel abgedampft. Zuletzt wurde die Gallensalzstocklösung zugesetzt, das Gefäß fest mit einer Teflonkappe verschlossen, mit Teflonband versiegelt und bei 37°C 18 Stunden lang unter sanftem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde wieder das organische Lösungsmittel unter Stickstoff verdampft und Reste durch Lyophilisation beseitigt. Die lyophilisierten Modellgallen wurden entweder sofort rekonstituiert oder bei - 25°C einige Tage gelagert.

Zur Herstellung einer reinen Kunstgalle wurden die trockenen Lipide mit Hepes/Kochsalz Puffer rekonstituiert, sodaß das Endvolumen genau 1ml wurde. Wieviel μ l Puffer zu den Lipiden gegeben werden mußte, wurde in Pilotexperimenten ermittelt. Da hier leichte Abweichungen des wirklichen CSI gegenüber dem berechneten auftreten können, wurde in allen Modellgallen nach der Fertigstellung (d.h. nach dem Filtern, s.u.) die Lipidkonzentrationen durch Lipidassays bestimmt und der aktuelle CSI berechnet, der im allgemeinen weniger als 5% vom berechneten entfernt war.

Der Puffer (0.15M NaCl, 10mM Hepes, pH7.5) wurde unter Verwendung von zweimal destilliertem Wasser und hochgereinigtem Kochsalz (Analytical Grade) hergestellt, das im Ofen für mindestens zwei Stunden auf 600C erhitzt wurde zur Beseitigung von organischen Verunreinigungen.

Nach der Rekonstitution der Lipide mit Puffer wurden die Gefäße

nach Überlagerung der Modellgalle mit Stickstoff fest mit Teflonkappen und Teflonband verschlossen und unter sanftem Schütteln bei 55°C inkubiert, bis die Lösung unter dem Phasenkontrastmikroskop isotrop war, d.h. kein positiv doppelbrechendes Material sichtbar war. Normalerweise war dies nach 18-24 Stunden der Fall. Die Kunstgallen wurden durch sterile 0.22µm Millipore Filter, die auf 55°C aufgewärmt wurden, gefiltert in vorgewärmte sterile, säuregewaschene, kratzerfreie Glasgefäße und die Nukleationszeiten bestimmt wie im folgenden beschrieben.

Nukleationszeitmessung:

Die Nukleationszeiten wurden nach Holan u. Holzbach gemessen (71) mit den Modifikationen für Kunst- bzw. rekombinierte Gallen, die von Holzbach u.a. 1984 beschrieben wurden (77).

Jede isotrope 55°C warme Kunstgalle oder Rekombinante (Def. siehe Rekombinationsexperimente) wurde gefiltert wie oben beschrieben, mit der Hamiltonpipette wurde 2 x 50µl zur Lipidanalyse entnommen, danach wurde die Probe mit Stickstoff überlagert, fest verschlossen und in einen auf 37°C geheizten Brutschrank gestellt. Alle Schritte wurden in einem auf 37°C aufgeheizten Plexiglaskasten ausgeführt, da eine Abkühlung der Probe unter 37°C unbedingt vermieden werden mußte. Als Nullzeit für die Nukleationszeitbestimmung wurde der Zeitpunkt 30 min nach dem Filtern gewählt, da die Proben dann auf 37°C equilibriert waren. Zur Nullzeit und alle 4-8 Stunden danach wurden die Proben unter normalem und polarisiertem Licht auf die Entwicklung von Liquid crystals und Cholesterinmonohydratkristallen sowie nichtdoppelbrechenden Vesikelaggregaten untersucht. Das Intervall zwischen

der Nullzeit und der Entdeckung des ersten Cholesterinmonohydrat-kristalles wurde als Nukleationszeit definiert.

Zur Untersuchung der Proben auf Kristalle wurde jeweils aus der Mitte, dem Boden des Gefäßes und der obersten Schicht der Probe ein Tropfen Kunstgalle entnommen, und zwar mit vorgewärmten, gewaschenen Pasteurpipetten, und auf einen mit Methanol vorgewaschenen staubfreien Objektträger aufgebracht, mit einer Deckplatte bedeckt und sofort unter dem Mikroskop, deren Objekttisch auf 37°C aufgeheizt worden war, untersucht.

NUKLEATIONSZEITMESSUNG

1.) INKUBIEREN



45 - 55 °C

2.) FILTERN



3.) ALIQUOT ENTNEHMEN



37 °C



4.) INKUBIEREN



5.) NUKLEATIONSZEITPUNKT MESSEN

Experimente mit Mischungen aus Nativ- und Kunstgalle:

Alle Nativgallen wurden bei 20 000 g und 37°C zentrifugiert und die Interphase zwischen dem Sediment (Zelldebris, Muzingel, Cholesterinpräzipitate) und der oben schwimmenden liquid-kristallinen Phase (falls vorhanden) wurde mit einer Spritze aspiriert. In dieser Gallenflüssigkeit wurden die Konzentrationen der Hauptbestandteile Cholesterin, Phospholipide, Gallensalze, Protein, Gesamtbilirubin und nicht-dialysierbare Gesamthexosen gemessen.

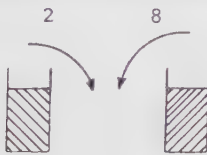
Zwei isotrope Modellgallen wurden wie oben beschrieben hergestellt mit den Gesamtlipidgehalten von 3 und 4 g/dl und den Cholesterinsättigungsindizes von 2.3 und 2.6, respektive. Zweihundert Mikroliter von jeder Nativgalle wurden mit 800 ul von jeder Modellgalle gemischt. Die Mischungen wurden mit Stickstoff überlagert, fest verschlossen und mit Teflonband versiegelt und bei 50°C 18 Stunden lang unter sanftem Schütteln inkubiert um möglicherweise in der Nativgalle noch vorhandene Cholesterinmikrokristalle aufzulösen.

Gleichzeitig wurde eine Serie von Modellgallen hergestellt, sodaß für jede Nativgalle/Kunstgalle Mischung eine reine Kunstgalle mit gleichem Cholesterinsättigungsindex und Gesamtlipidgehalt vorhanden war.

Nach der Inkubation waren alle Proben unter dem Lichtmikroskop isotrop. Die Proben wurden gefiltert wie oben beschrieben und die Nukleationszeiten bestimmt. Nach 14 Tagen wurde die Nukleationszeitbestimmung abgebrochen.

MISCHEN VON NATIV- UND KUNSTGALLE

HERSTELLUNG REINER KUNSTGALLE



GLEICHER CSI
GLEICHER GESAMTLIPIDGEGEHT



↓
INKUBIEREN

↓
FILTERN

↓
ALiquOT ENTNEHMEN

↓
NUKLEATIONSZEIT BESTIMMEN

Versuchsschema zu den Experimenten mit Nativgalle/
Kunstgalle Mischungen

Experimente mit Rekombinanten aus Kunstgalle und delipidisierter Leber und Blasengalle:

Gallenblasen- und Lebergalle wurde mit der neu entwickelten Butanolextraktions/Diafiltrationsmethode delipidisiert. Die Proteinkonzentrationen wurden in der Steinträger- und Kontrollgruppe auf den gleichen Median und Abweichung des Medians eingestellt. Lebergalle wurde vor der Delipidisierung 5-10fach konzentriert um eine Endproteinkonzentration sicherzustellen, die mindestens so hoch wie die der Proben aus Blasengalle lag.

Aus jeder lipidfreien Galle wurden gepaarte Proben hergestellt:

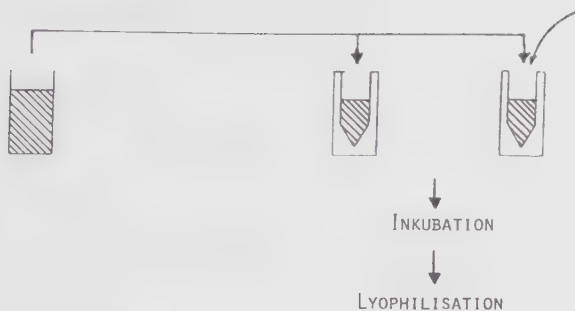
Ein Milliliter jeder Probe wurde in zwei Reaktionsgefäße pipettiert. In einem Gefäß wurden die Proteine mit Pronase (Pronase-CB, CalBiochem-Behring, La Jolla, CA) hydrolysiert. Dabei wurde nach dem Protokoll von Hoenders u.a.(70) vorgegangen mit einigen Modifikationen, und zwar wurden 8 Proteaseeinheiten pro mg Protein verwendet und die Inkubationszeit betrug 9 Stunden. Als Puffer wurde ein Hepes/Kochsalzpuffer verwendet mit 10mM Kalziumchlorid, da Pronase kalziumabhängig ist. Im anderen Gefäß wurde nur der Puffer ohne Pronase zugesetzt. Die Probenpaare wurden 9 Stunden lang bei 37°C inkubiert und anschließend in ihren Gefäßen lyophilisiert. SDS-PAGE wurde mit Aliquots der Proben ausgeführt um das Ausmaß der Proteinzerstörung feststellen zu können.

Eine isotrope Modellgalle mit einem Cholesterinsättigungsindex von 1.15, einem Gesamtlipidgehalt von 20g/dl und einem Lezithin/Gallensalz Verhältnis von 0.2 wurde hergestellt. Je genau 1 ml dieser Modellgalle wurde zu der Pronase-behandelten und der unbehandelten Probe zugegeben, die Probenpaare mit Stickstoff überlagert, die Gefäße fest verschlossen und bei 45°C weitere 12

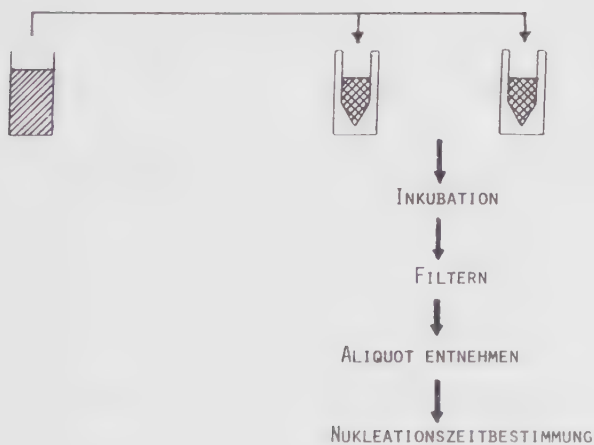
1.) DELIPIDISIERUNG

2.) PRONASE-VERDAUUNG

100 µg Pronase



3.) REKOMBINATION MIT KUNSTGALLE



Versuchsschema zu den Experimenten mit Rekombinanten aus Kunstgalle und delipidisierten und lyophilisierten biliären Proteinen

Stunden inkubiert zum vollständigen Vermischen. Danach wurden die Probenpaare gefiltert und die Nukleationszeiten bestimmt.

Berechnung der Cholesterinsättigungsindices:

Alle Cholesterinsättigungsindices wurden anhand der von Carey aufgestellten Tabellen berechnet (30)

Statistische Auswertung:

Der Wilcoxon Test wurde zum Vergleich der Gruppen verwendet. Alle Daten sind als Median und Standardabweichung des Median angegeben. Statistische Signifikanz wurde definiert als $p < 0.05$.

Ergebnisse:

Testung der Wirksamkeit des neuen Delipidisierungsverfahrens:

Dreiunddreißig unselektierte menschliche Blasengallen mit einem Gesamtfeststoffgehalt zwischen 3 und 26 g/dl wurden mit der entwickelten Technik wie im Methodenteil beschrieben delipidiert. Gemessen wurde der Cholesterin-, Phospholipid- und Gallensalzgehalt, die Proteinkonzentration und die nicht-dialysierbaren Neutralzucker vor und nach der Delipidisierung in jeder Probe. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse in Bezug auf Proteinausbeute und Lipidentfernung dargestellt.

Die Gesamtproteinausbeute lag bei 60%, die Lipidentfernung bei 99%. Dabei muß bedacht werden, daß in die Proteinkonzentration der Nativgalle auch Muzine, zelluläres Material und kleine Peptide eingehen, die während der Methode notwendigerweise und auch wünschenswerterweise entfernt werden.

TABELLE 1	Protein (mg/ml)	Cholesterin (mg/ml)	Phospholipide (mg/ml)	Gallensalze (mg/ml)
nativ	2.31±0.30	4±0.71	28.82±4.43	48.3±8.3
delipidisiert	1.20±0.12	0±0.00	0.09 ±0.12	1.1±0.40
	Ausbeute (%)	Entfernung (%)		
	58.5±2.30	100±0.0	99.9±0.028	98.0±1.4

Tabelle 1: Protein- und Lipidkonzentrationen von 33 menschlichen Blasengallen vor und nach Delipidisierung mit der Butanolextraktions/Diafiltrationstechnik. Die Proteinausbeute und die Lipidentfernung ist in Prozent unter den absoluten Zahlen aufgeführt.

Die Gallensalzkonzentration lag in einigen Proben nach Delipidierung noch bei 2-5%. Dies trat häufiger bei den sehr hoch konzentrierten Gallen auf. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment der Gesamtfeststoffgehalt in allen Proben auf 7g/dl standardisiert. Der Gesamtfeststoffgehalt ist eine äußerst schnell und einfach zu messende Größe (siehe Methodenteil) und gibt eine grobe Vorstellung von der Konzentriertheit der Galle. Die Standardisierung erfolgte entweder durch Verdünnung von konzentrierteren Proben mit Hepes/Kochsalzpuffer oder Verwendung von entsprechend mehr Volumen von schwächer konzentrierten Gallen und nachfolgender Konzentrierung der Probe während der Diafiltration. Die Resultate sind in Tabelle 2 zu sehen.

Die Proteinausbeute lag bei 70%, die Lipidentfernung bei >99.5%. Durch die Standardisierung wurde eine hohe Gallensalzentfernung in allen Proben erzielt.

TABELLE 2	Protein (mg/ml)	Cholesterin (mg/ml)	Phospholipide (mg/ml)	Gallensalze (mg/ml)
nativ	1.24±0.44	2.61±1.79	28.17±11.4	41.70±8.3
delipidisiert	0.78±0.26	0±0.00	0.34±0.1	0.28±0.30
	Ausbeute (%)	Entfernung (%)		
	70.8±32.6	100±0.0	99.1±0.468	99.7±0.06

Tabelle 2: Protein- und Lipidkonzentrationen von 9 menschlichen Bläsengallen vor und nach Delipidisierung und Standardisierung des Gesamtfeststoffgehaltes auf 7g/dl.

Zur Testung der Reproduzierbarkeit der Methode wurden 6 identische Proben einzeln nacheinander delipidisiert. Die Resultate sind in Tabelle 3 zu sehen, wobei die Werte normalverteilt waren und in Mittelwert und Standardabweichung angegeben sind.

Die Methode erwies sich als gut reproduzierbar.

TABELLE 3	Protein (mg/ml)	Cholesterin (mg/ml)	Phospholipide (mg/ml)	Gallensalze (mg/ml)
nativ	7.15	5.17	16.53	29.70
delipidisiert	3.92 <u>±</u> 0.12	0 <u>±</u> 0.00	0.12 <u>±</u> 0.04	0 <u>±</u> 00
	Ausbeute (%)	Entfernung (%)		
	54.3 <u>±</u> 2.1	100 <u>±</u> 0.0	99.3 <u>±</u> 0.25	100 <u>±</u> 0

Tabelle 3: Delipidisierung von 6 identischen Proben zur Testung der Reproduzierbarkeit.Die Werte sind in Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Die Technik wurde anschließend mit der bisher verwendeten Methode verglichen. Identische Proben von fünf Normalgallen mit hohen Protein- und Lipidkonzentrationen (für schwächer konzentrierte Gallen ist die Proteinausbeute bei Verwendung der Detergens-Delipidisationsmethode äußerst niedrig) wurden mit beiden Methoden delipidisiert.

Die Resultate sind in Tabelle 4 aufgezeigt. Die Proteinausbeute und Phospholipidentfernung war signifikant besser bei der Butanolextraktions/Diafiltrationsmethode ($p < 0.0001$ und $p < 0.001$, respektive).

Auf Grund des sehr hohen Gallensalzgehaltes der Nativproben (es wurde keine Standardisierung des Gesamtfeststoffgehaltes auf 7g/dl durchgeführt) von 104.3 mg/ml im Mittel war die Gallensalz-entfernung nur 95% bei Verwendung der neuen Probe, nach weiterem Waschen mit 20ml Puffer (Ausgangsvolumen der eingesetzten Nativgalle war 4 ml) war die Gallensalzentfernung bei 99.4% ohne signifikanten weiteren Proteinverlust.

Tabelle 4		Protein		Cholesterin		Phospholipide		Gallensalze	
		(mg/ml)	% Ausb.	(mg/ml)	% Entf.	(mg/ml)	% Entf.	(mg/ml)	% Entf.
Butanol	nativ	2.30+3.07	58+11.5	5.76+1.30	100+0.3	48.30+3.60	97+1.1	104.3+39.8	94+2.2
	delipid.	1.39+3.16		0.00+0.08		1.03+0.13		8.4+3.2	
Deterg.	nativ	2.30+3.07	26+3.17	5.76+1.30	98+2.0	48.30+3.60	87+3.7	104.3+39.8	100
	delipid.	0.81+0.98		0.17+0.37		5.20+0.46		-	

Tabelle 4: Vergleich der Butanolextraktions/Diafiltrationsmethode mit der Detergens-Delipidisationsmethode anhand der Delipidisierung von 5 Normalgallen mit beiden Techniken.

Als nächstes wurde die neue Methode mit der für Lipoproteine häufig angewandten Äther/Äthanol-Extraktion verglichen. Von drei verschiedenen Gallen wurden je 6 identische Proben mit beiden Techniken delipidisiert.

Die Resultate sind in Tabelle 5 zu sehen. Während die Proteinausbeute vergleichbar war in 2 von 3 Gallen und in einer wesentlich schlechter mit der Äther/Äthanolextraktion, zeigte sich in 2 von 3 Gallen eine ungenügende Phospholipidentfernung mit der Äther/Äthanolextraktionstechnik.

Überprüfung der qualitativen Proteinausbeute

Es wurde überprüft, ob sich der selektive Verlust bestimmter Gallenproteine während der Delipidisierung erkennen ließ. Das Bandenmuster von Nativ- und delipidisierter Galle auf 7-20% SDS-Page-Gradientengelen ließ keinen selektiven Verlust erkennen. Obwohl die sehr empfindliche Silberfärbung zum Anfärben der Banden verwendet wurde, läßt sich ohne Densitometrie kein quantitativer Verlust erkennen. Außerdem könnten Proteine, die in extrem kleinen Mengen unterhalb der Nachweisgrenze der Silberfärbung verlorengegangen sein. Hochmolekulare Muzine präzipitierten auf Grund ihrer Hydrophobizität zum großen Teil an der Interphase zwischen Butanol- und wässriger Phase, was ein erwünschter Effekt war. Diese polymeren Mucopolysaccharide führen nämlich beim Filtern der rekombinierten Modellgallen (siehe Methodenteil Nukleationsexperimente) zu einer Verstopfung der Filter.

Tabelle 5	Galle 1		Galle 2		Galle 3	
	Protein	Phospholipid	Protein	Phospholipid	Protein	Phospholipid
Butanol	54.3%	99.3%	82.0%	99.9%	65.0%	99.9%
Äther- Äthanol	61.2%	62.0%	64.8%	89.0%	32.0%	99.0%

Tabelle 5: Vergleich der Butanolextraktions/Diafiltrationstechnik mit der Äther/Äthanolextraktion anhand der Delipidisierung von je sechs identischen Proben aus drei verschiedenen Gallenblasen mit beiden Methoden. Jeder Wert stellt den Mittelwert aus diesen 6 Delipidisationen dar.

Ergebnisse der Nukleationsstudien

Experimente mit Nativgalle-Kunstgalle-mischungen:

Wir bestimmten die Nukleationszeitverkürzung in Nativ/Kunstgalle-gemischen aus 14 Steinträgergallen, 9 Normalgallen und 4 Gallen von Patienten mit Pigmentsteinen (2) und Cholecystitis (2) ohne Stein in der Gallenblase. Alle Gallen waren Blasengallen.

Kleine Mengen nativer Galle wurden mit einer isotropen Kunstgalle mit hohem CSI und niedrigen Gesamtlipidgehalt im Verhältnis 1:4 gemischt. Die Nukleationszeiten dieser Mischungen wurden verglichen mit den Nukleationszeiten von reinen Kunstgallen. Ein Paar bestand jeweils aus einer Nativ/Kunstgalle-mischung und einer reinen Kunstgalle mit (innerhalb der Meßgenauigkeit) gleichem CSI und gleichem Gesamtlipidgehalt.

In Abbildung 1 sind die Nukleationszeiten der Mischungen als schraffierte Balken zu sehen und die der korrespondierenden Kunstgallen als nichtschraffierte Balken. Die meisten Mischungen aus Steinträger- und Kunstgalle (10 aus 14) hatten wesentlich kürzere Nukleationszeiten als die entsprechenden Kunstgallen. Normalgallen dagegen veränderten die Nukleationszeiten der Mischungen nicht gegenüber den Zeiten der korrespondierenden reinen Kunstgallen oder verlängerten sie in in zwei Fällen. In den zwei Pigmentgalle/Kunstgalle-mischungen wurde keine und schwache Nukleationszeitverkürzung gefunden; in den Mischungen aus Cholecystitisgalle und Kunstgalle dagegen fand sich eine ausgeprägte Verkürzung.

Abbildung 1:

Nukleationszeiten der gepaarten Proben, d.h. der Nativ/Kunstgalle-mischungen (schraffierte Balken) und der reinen Kunstgallen mit gleichem CSI und Gesamtlipidgehalt (nichtschrattierte Balken). Gruppe A: Normalgallen; Gruppe B: Steinträgergallen; Gruppe C: Pigmentsteingallen (erste zwei Paare) und Cholecystitisgallen ohne Steinnachweis (letzte zwei Paare). Die Mediane der Nukleationszeiten von Gruppen A und B sind unterhalb des Bildes aufgeführt. Der Unterschied zwischen den Nukleationszeiten der Nativ/Kunstgalle-mischungen und der entsprechenden reinen Kunstgallen ist in Gruppe A nicht signifikant ($p > 0.1$), in Gruppe B signifikant für $p < 0.001$.

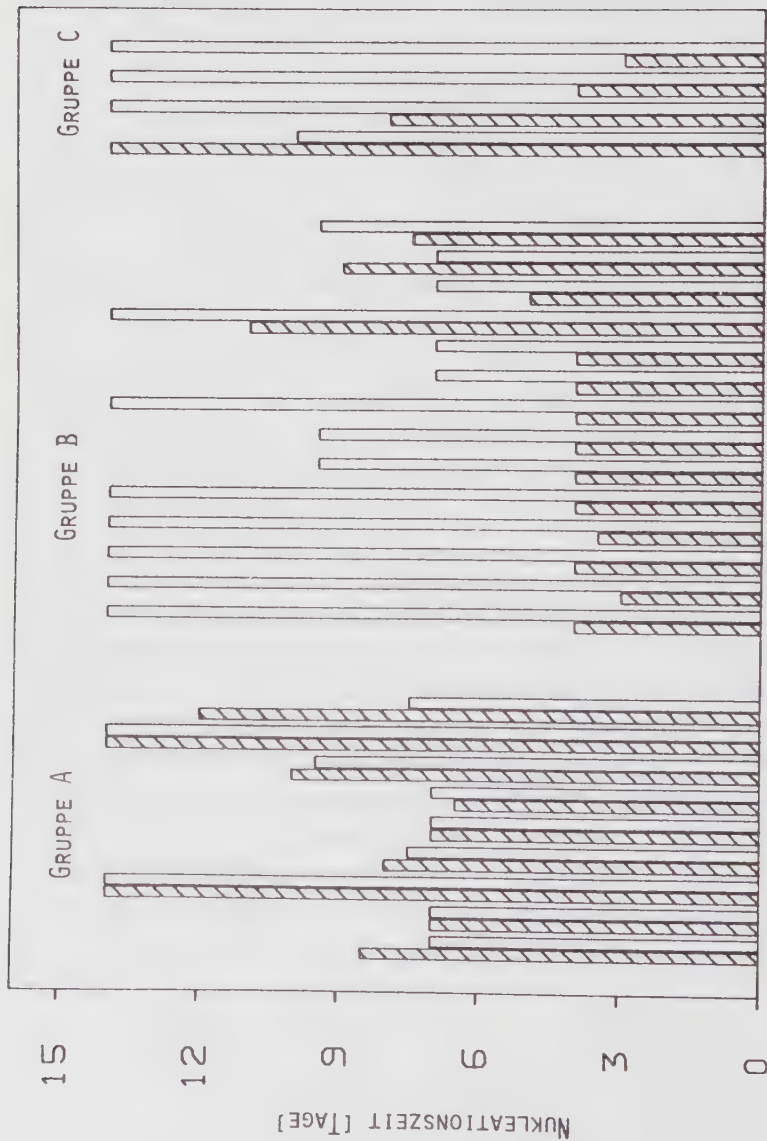
Tabelle 1:

(siehe nächste Seite)

CSI, Gesamtlipidgehalt und Nukleationszeiten der gepaarten Proben. Es wurden nur solche Probenpaare in die Studie aufgenommen, bei denen CSI und Gesamtlipidgehalt in den reinen Kunstgallen entweder gleich oder etwas höher waren als in den entsprechenden Nativ/Kunstgalle-mischungen. Dies würde eine kürzere Nukleationszeit in der Kunstgalle bewirken und so ein weniger signifikantes Ergebnis.

NZ
GEMISCH

NZ
KUNSTG.



MEDIAN DER
NZ [TAGE] 9,3±2,1

MEDIAN DER
NZ [TAGE] 4,0±0,3

MEDIAN DER
NZ [TAGE] 7,5±2,1

MEDIAN DER
NZ [TAGE] 12,0±2,0

Abbildung 1

Tabelle 1

NATIV-/KUNSTGALLEMISCHUNGEN				KONTROLL-KUNSTGALLEN		
Probe Nr.	CSI	Gesamtlipid- gehalt in %	Nukleationszeit (Tage)	CSI	Gesamtlipid- gehalt in %	Nukleationszeit (Tage)
Gruppe A						
1	1.68	4.8	8.5	1.82	4.7	7
2	1.75	4.4	7	1.82	4.7	7
3	2.31	3.2	>14	2.30	3.2	>14
4	1.90	4.9	8	1.97	4.9	7.5
5	1.69	4.7	7	1.82	4.7	7
6	1.51	4.5	6.5	1.82	4.7	7
7	1.42	4.8	10	1.37	5.3	9.5
8	1.89	3.6	>14	1.98	3.8	>14
9	1.88	5.0	12	1.97	4.9	8.5
Gruppe B						
1	2.34	3.0	4	2.30	3.2	>14
2	2.56	3.7	11	2.65	3.8	>14
3	3.14	2.8	3	3.07	2.7	>14
4	2.20	4.1	4	2.13	4.1	>14
5	2.26	3.0	3.5	2.30	3.2	>14
6	2.07	3.6	4	1.98	3.8	>14
7	1.36	4.9	4	1.37	5.3	9.5
8	1.20	4.5	4	1.37	5.3	9.5
9	1.68	3.5	4	1.98	3.8	14
10	1.62	4.4	4	1.80	4.6	7
11	1.51	4.4	4	1.52	5.8	7
12	1.80	4.8	5	1.80	4.7	7
13	2.16	4.8	9	1.82	4.7	7
14	1.80	5.4	7.5	1.78	5.9	9.5
Gruppe C						
1	1.36	6.3	14	1.37	5.3	10
2	1.56	3.6	8	1.98	3.8	14
3	2.27	3.2	4	2.30	3.2	14
4	1.54	3.6	3	2.60	3.8	14

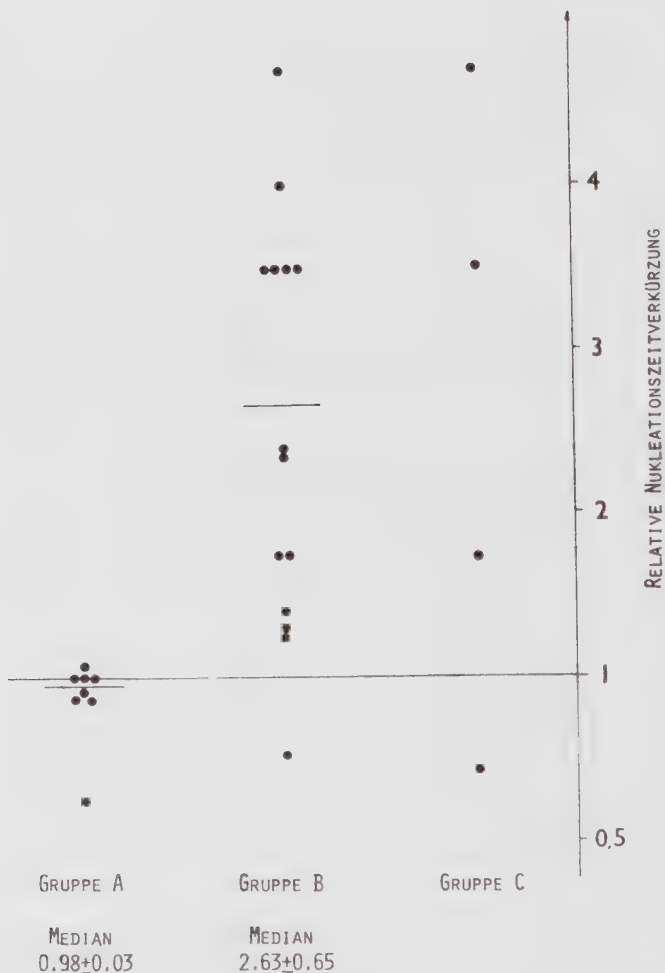


Abbildung 2:

Relative Nukleationszeitverkürzung der Nativ/Kunstgalle-mischungen gegenüber den entsprechenden reinen Kunstgallen. Jeder Punkt repräsentiert den Quotienten zwischen der Nukleationszeit der reinen Kunstgalle und der der Mischung für ein Paar. Der Unterschied in den relativen Nukleationszeitverkürzungen von Gruppe A gegenüber Gruppe B ist signifikant für $p < 0.001$.

Die mittlere Nukleationszeit in Tagen lag in der Gruppe der Normalgallen bei 7.5 ± 2.1 für die Kunstgallen und bei 9.3 ± 2.1 für die Nativ/Kunstgallelemischungen. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p > 0.1$). Im Steinträgerkollektiv dagegen lag die mittlere Nukleationszeit der Kunstgallen bei 12 ± 2 Tagen und die der Nativ/Kunstgallelemischungen bei 4 ± 0.3 Tagen. Der Unterschied ist signifikant für $p < 0.001$.

In Abbildung 2 ist die relative Nukleationszeitverkürzung und damit das Ausmaß des nukleationsfördernden Effektes jeder Galle dargestellt. Jeder Punkt stellt das Verhältnis dar zwischen der Nukleationszeit der Kunstgalle und der korrespondierenden Nativ/Kunstgallelemischung. Die mittlere Nukleationszeitverkürzung durch Zugabe von Steinträgergalle lag bei 2.63 ± 0.65 verglichen mit 0.98 ± 0.03 bei Zugabe von Normalgalle. Der Unterschied ist signifikant für $p < 0.001$.

Die Resultate deuten darauf hin, daß in den meisten Gallen von Cholesterinsteinträgern Substanzen vorhanden sind, die die Nukleationszeit verkürzen und daß sie auch in schwachkonzentrierter = vesikelreicher Kunstgalle diesen Effekt ausüben.

Experimente mit Rekombinanten aus Kunstgalle und delipidierten und lyophilisierten biliären Proteinen:

A) Blasengalle:

Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe lassen auf die Existenz von nukleationsfördernden Substanzen in der Steinträgergalle schließen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob diese Substanzen biliäre Proteine sind.

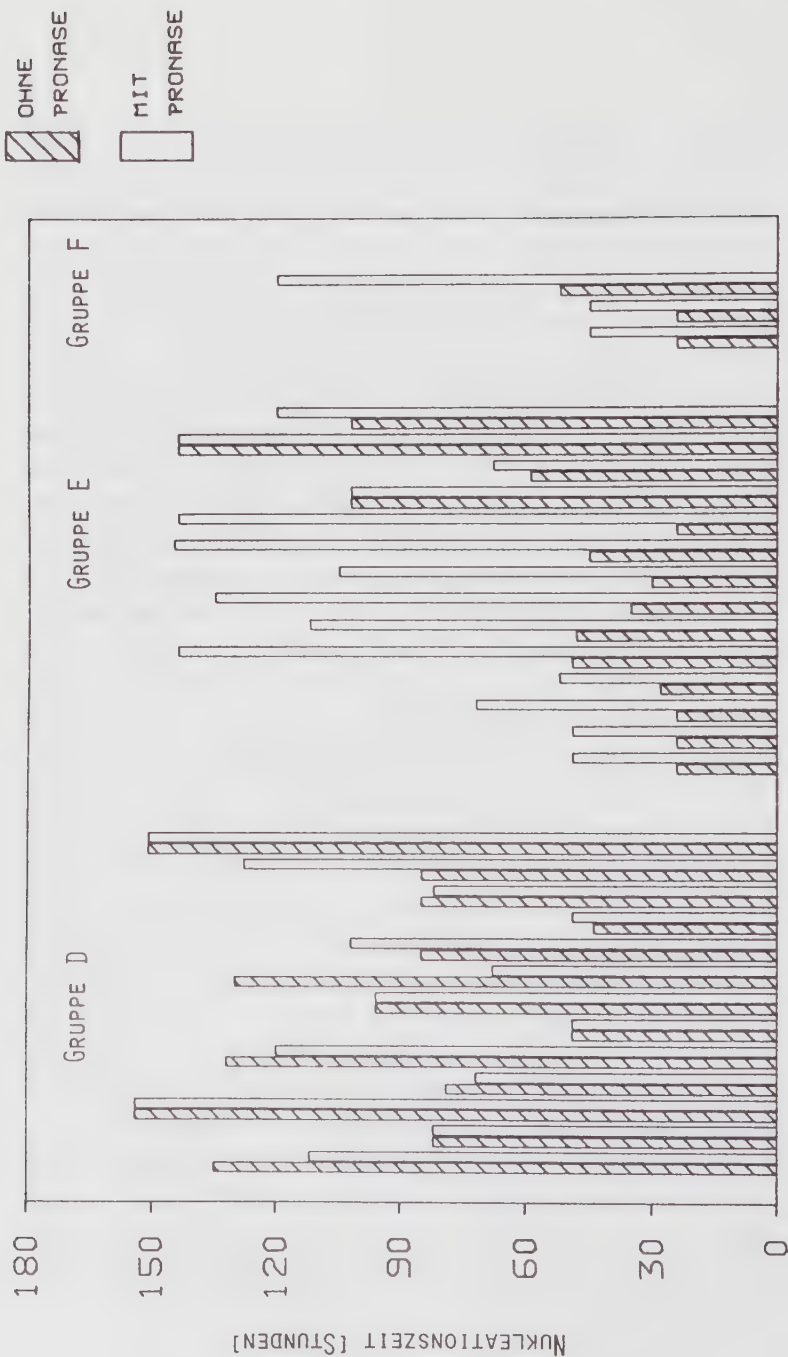
Wir stellten Rekombinantenpaare her aus isotroper Kunstgalle und delipidierten Steinträger- und Normalgallenproteinen. In einer Probe jedes Paares wurden die Proteine mit Pronase hydrolysiert, in der zweiten identischen Probe blieben sie intakt.

Falls die nukleationsfördernden Substanzen Proteine sind, so ist eine längere Nukleationszeit in den Pronase-behandelten Proben gegenüber den unbehandelten sonst identischen Proben zu erwarten.

In Abbildung 3 sind die Nukleationszeiten der Pronase-behandelten und unbehandelten Proben als nichtschraffierte und schraffierte Balken zu sehen. Die mittlere Nukleationszeit (in Stunden, da in diesem Experiment wesentlich konzentriertere Modellgallen mit deshalb kürzeren Nukleationszeiten verwendet wurden) betrug 40 ± 11 Stunden in den Rekombinanten des Steinträgerkollektives und wurde durch Pronase-Behandlung der Proben auf 108 ± 22 Stunden verlängert. Im Normalkollektiv trat kein Unterschied auf zwischen den Nukleationszeiten der Pronase-behandelten und unbehandelten Rekombinanten (89.5 ± 15 gegenüber 85 ± 15 Stunden). Der CSI der Proben variierte etwas zwischen 1.06 und 1.20 und dies ist ein Grund für die Unterschiede in den absoluten Nukleationszeiten der

Abbildung 3:

Nukleationszeiten der Rekombinaten aus isotropen Modellgallen und delipidisierten Blasengallen. Die schraffierten Balken zeigen die Nukleationszeiten der unverdauten, die weißen Balken die der mit Pronase behandelten Rekombinanten. Gruppe D: Aus Normalgallen hergestellte Rekombinaten; Gruppe E: aus Steinträgergalle; Gruppe F: aus Gallen von Patienten mit Cholecystitis ohne Steinnachweis. Unter dem Bild sind die Mediane der Nukleationszeiten in Stunden angegeben. Der Unterschied der Nukleationszeiten zwischen mit Pronase behandelten und nichtbehandelten, sonst identischer Rekombinate war nur im Steinträgerkollektiv signifikant ($p < 0.001$). Der Unterschied zwischen den Nukleationszeiten der nicht mit Pronase behandelten Rekombinaten aus Normal- und Steinträgergallen war signifikant für $p < 0.01$.



MEDIAN DER
NZ [STUNDEN]

85±15
89±15

MEDIAN DER
NZ [STUNDEN]

40±11
108±22

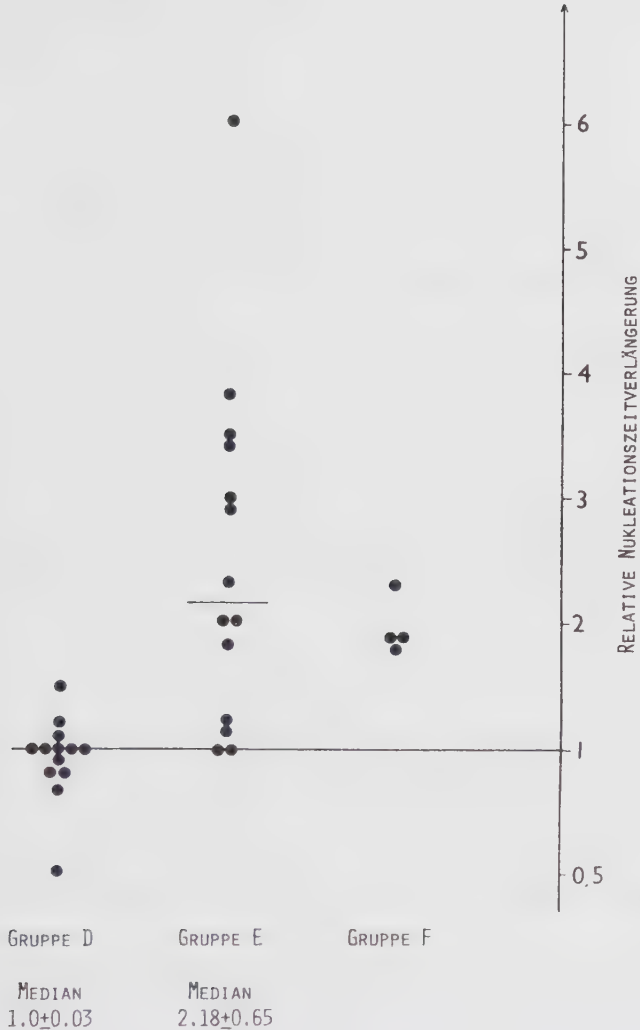


Abbildung 4:

Relative Nukleationszeitverlängerung der Pronase-behandelten Proben gegenüber den nicht behandelten Rekombinaten. Jeder Punkt gibt den Quotienten an zwischen der Nukleationszeit der Pronase-behandelten und der der nichtbehandelten Rekombinante eines Paares. Die Mediane der Nukleationszeitverlängerungen sind unter dem Bild aufgezeigt. Der Unterschied zwischen Steinträger- und Normalkollektiv ist signifikant für $p < 0.001$.

Pronase-behandelten Proben. Der mittlere CSI war jedoch in Steinträger- und Normalkollektiv identisch, da jeweils Rekombinanten von Normal- und Steinträgergallen in einem Experiment mit derselben Modellgalle verarbeitet wurden.

In Abbildung 4 ist das Ausmaß der durch Proteinverdauung erzielten Nukleationszeitverlängerung dargestellt. Jeder Punkt zeigt das Verhältnis der Nukleationszeiten mit und ohne Proteinverdauung für ein bestimmtes Probenpaar. Es erfolgte eine mittlere Nukleationszeitverlängerung durch Proteinverdauung um das 2.18 ± 0.53 fache in den mit Proteinen aus Steinträgergalle hergestellten Rekombinanten. In den aus Normalgalle hergestellten Rekombinanten erfolgte keine solche Verlängerung (mittlere Nukleationszeitverlängerung 1.0 ± 0.03). Der Unterschied zwischen Steinträger und Normalgruppe ist signifikant für $p < 0.001$.

Die Gesamtproteinkonzentration der Rekombinanten war im Steinträger- und Normalkollektiv im gleichen Konzentrationsbereich. Die mittlere Proteinkonzentration in den aus Normalgalle hergestellten Rekombinanten lag bei 2.29 ± 2.14 mg/ml. die der aus Steinträgergalle gewonnenen Proben bei 2.34 ± 1.46 mg/ml.

Vier Rekombinanten aus dem Steinträgerkollektiv hatten lange Nukleationszeiten (>100 Stunden) und es trat keine Verlängerung dieser Nukleationszeiten durch Proteinverdauung auf. Drei der Gallen, aus denen die delipidisierten Proteine gewonnen worden waren, waren bereits in den Nativgalle-Kunstgalle Mischungen der ersten Versuchsreihe eingesetzt worden und hatten auch dort keine nukleationsverkürzende Wirkung gezeigt.

Vier Rekombinanten aus Galle von Patienten mit Pigmentsteinen und steinloser Cholecystitis zeigten ebenfalls eine Verlängerung der Nukleationszeit durch Proteinverdauung, die Pigmentsteingallen

allerdings eine viel weniger ausgeprägte.

Die Ergebnisse weisen auf die Existenz eines oder mehrerer Proteine in der Mehrheit der Blasengallen von Steinträgern hin, die die Nukleationszeit stark beschleunigen.

B) Lebergalle:

Aus den Ergebnissen der letzten Versuchsreihe läßt sich die Existenz nukleationsfördernder Proteine in der Blasengalle vieler Gallensteinpatienten ableiten.

Falls diese Proteine von der Leber sezerniert würden, so sollten die Nukleationszeiten von Rekombinanten, die aus delipidisierter Lebergalle von Steinträgern hergestellt worden sind, kurz sein und durch Proteinverdauung verlängert werden.

Deshalb stellten wir Probenpaare her aus isotroper Modellgalle und delipidisierten Pronase-verdauten und unverdauten Lebergallen von Steinträgern ($n = 7$) und Normalpersonen ($n = 6$).

In Abbildung 4 sind die Nukleationszeiten der pronase-behandelten Rekombinanten als nichtschrattierte Balken und der unbehandelten als schrattierte Balken zu sehen. Der Unterschied zwischen Steinträger- und Normalkollektiv in den absoluten Nukleationszeiten war nicht signifikant und es trat auch keine signifikante Verlängerung der Nukleationszeit durch Proteinverdauung auf, weder in der Steinträgergruppe noch im Normalkollektiv. In Abbildung 5 ist die relative Nukleationszeitverlängerung durch Proteinverdauung zu sehen. Weder im Normalkollektiv noch im Steinträgerkollektiv war eine signifikante Verlängerung zu sehen (1.21 ± 0.3 in den

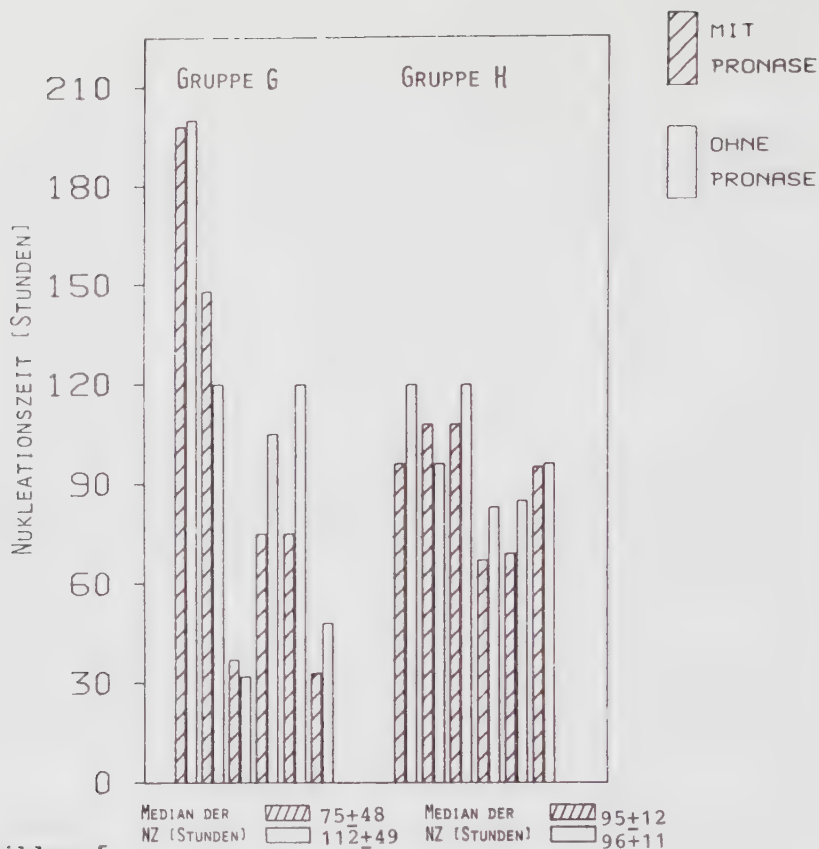


Abbildung 5:

Nukleationszeiten der Rekombinaten aus isotropen Modellgallen und delipidisierten Lebergallen. Die schraffierten Balken zeigen die Nukleationszeiten der unverdauten, die weißen Balken die der mit Pronase behandelten Rekombinanten. Gruppe G: Aus Lebergallen von Normalpersonen hergestellte Rekombinaten; Gruppe H: aus Lebergallen von Cholesterinsteinträgern. Unter dem Bild sind die Mediane der Nukleationszeiten in Stunden angegeben. Der Unterschied der Nukleationszeiten zwischen mit Pronase behandelter und nichtbehandelter, sonst identischer Rekombinate war in keiner Gruppe signifikant ($p > 0.1$). Der Unterschied zwischen den Nukleationszeiten der nicht mit Pronase behandelten Rekombinaten aus Normal- und Steinträgergallen war nicht signifikant ($p > 0.1$).

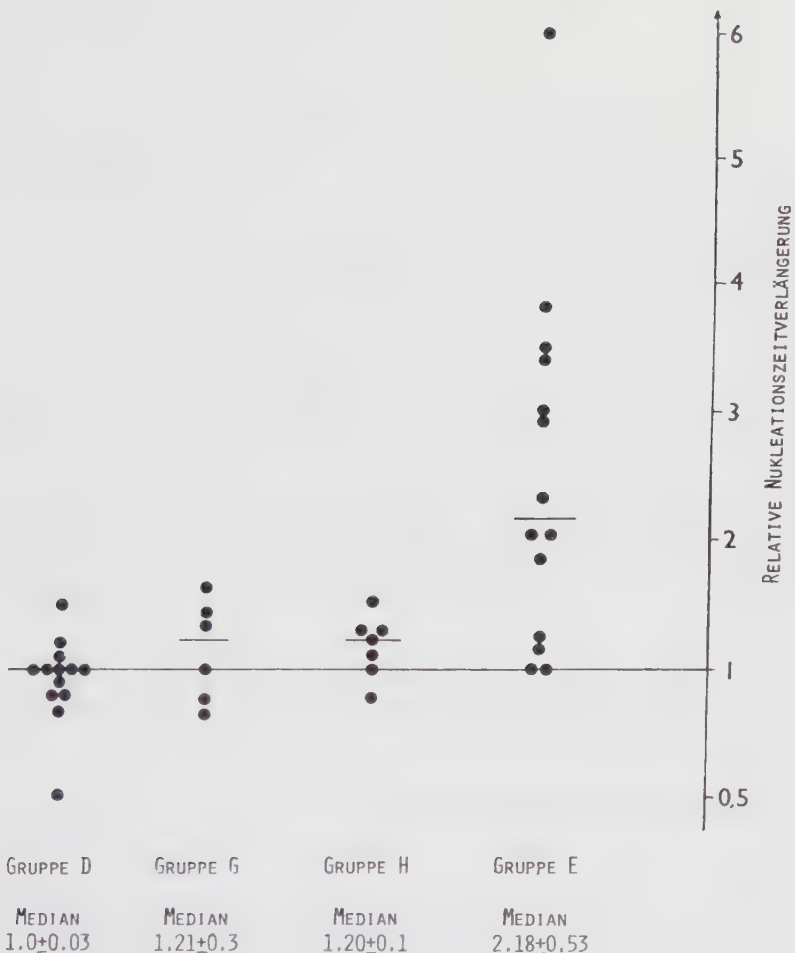


Abbildung 6:

Relative Nukleationszeitverlängerung durch Proteinverdauung in aus delipidisierten Lebergallen von Normalpersonen (Gruppe G) und Cholesterinsteinträgern (Gruppe H). Die Ergebnisse des entsprechenden Versuches mit Blasengallen sind ganz rechts und links aufgezeigt. die Mediane der Nukleationszeitverlängerungen sind unter dem Bild aufgeführt. Kein signifikanter Unterschied war zwischen Steinträger- und Normalkollektiv zu finden ($p > 0.1$).

Normal- gegenüber 1.20 ± 0.1 in den Steinträgerrekombinanten). Dagegen war der Unterschied der mittleren Nukleationszeitverlängerung hochsignifikant zwischen den aus Lebergalle und den aus Blasengalle von Gallensteinpatienten gewonnenen Rekombinanten (1.20 ± 0.1 gegenüber 2.18 ± 0.53 , $p < 0.001$).

Die mittlere Proteinkonzentration lag bei 5.73 ± 4.04 mg/ml. Die sehr hohe Proteinkonzentration in einigen der Proben führte wahrscheinlich zu der leichten aber nicht signifikanten Verlängerung der Nukleationszeit durch Proteinverdauung im gesamten aus Lebergalle gewonnenen Probenkollektiv.

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe kann geschlossen werden, daß die nukleationsfördernden Proteine in der Blasengalle, aber nicht in der Lebergalle der meisten Cholesterinsteinträger vorhanden sind.

Damit ist wahrscheinlich, daß sie erst in der Gallenblase in die galle abgegeben werden.

Gelelektrophoreseuntersuchungen:

Wir verglichen das SDS-Page Bandenmuster von 25 delipidisierten Gallen (Normal- und Steinträgerblasengallen und -lebergallen), die auch in Rekombinationsexperimenten auf ihre nukleationsbeschleunigende Wirkung geprüft worden waren. Neben einer großen Variabilität im Bandenmuster fand sich dabei eine deutlich stärker ausgeprägte Bande im 68-70 000 Dalton-Bereich in den meisten Gallen (nur eine Überlappung) die die Nukleation beschleunigt hatten. Hochmolekulare Proteine (über 150 000 Dalten Molekulargewicht) konnten auf diesen Gradientengelen allerdings schlecht differenziert werden.

Glykoproteinkonzentration:

Die Konzentrationen der nicht- dialysierbaren Gesamthexosen wurden in den nativen und delipidisierten Gallen bestimmt als ungefähres Maß für die Glykoproteinkonzentration in den Proben.

Die mittlere Konzentration war in Steinträger- und Normalgallen gleich, und zwar sowohl in den Nativgallen ($0.59 \pm 0.16 \text{ mg/ml}$ gegenüber $0.68 \pm 0.23 \text{ mg/ml}$) wie auch in den delipidisierten Gallen ($0.28 \pm 0.08 \text{ mg/ml}$ gegenüber $0.27 \pm 0.25 \text{ mg/ml}$). Die Glykoproteinkonzentration pro Gramm Gesamtfeststoffgehalt war allerdings in den Steinträgergallen höher, wie schon von anderen beschrieben.

Signifikant höher war die mittlere Glykoproteinkonzentration in den delipidisierten und konzentrierten Lebergallen ($1.26 \pm 0.54 \text{ mg/ml}$).

Es fand sich keine Korrelation zwischen der Konzentration der nicht-dialysierbaren Gesamthexosen und dem Ausmaß der nukleationsbeschleunigenden Wirkung, weder in der ersten noch in der zweiten Versuchsreihe. Der Korrelationskoeffizient war -0.11 in den Nativ/Kunstgalle- Mischexperimenten und 0.4 in den Rekombinationsexperimenten zwischen Modellgalle und delipidisierten Gallenproteinen.

Bilirubinkonzentration:

Die Gesamtbilirubinkonzentration korrelierte ebenfalls nicht mit dem Ausmaß der Nukleationszeitverkürzung in der ersten Versuchs-

reihe und dem Ausmaß der Verlängerung durch Proteinverdauung in der zweiten.

Untersuchungen zur Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Zellelementen in der Nativgalle und der Cholesterinnukleation sowie der Proteinaseaktivität in der Galle:

In Zusammenarbeit mit Frau Marsh wurde ein Projekt fortgeführt, das in unserem Labor von Dr. Howell begonnen worden war. Damals war die Frage untersucht worden, ob das scheinbare Fehlen von antinukleierenden Proteinen in der Blasengalle von Steinträgern bedingt sein könnte durch eine hohe Proteinaseaktivität in den Steintränergallen. Dr. Howell hatte eine wesentlich höhere mittlere Aktivität in Steinträger- als in Normalgallen gefunden.

Bei der Weiterführung dieses Projektes zeigte sich, daß die Mediane der untersuchten Kollektive von Steinträger- und Normalgallen gerade signifikant unterschiedlich waren für $p < 0.05$. Die einzelnen Werte sind in Abbildung 7 aufgezeichnet. Es zeigte sich, daß der höhere Mittelwert bedingt war durch einige sehr hohe Proteinaseaktivitäten in Steintränergallen. Bei der weiteren Untersuchung waren einige dieser Gallen bakteriell infiziert, in anderen wurden bei der zytologischen Untersuchung Leukozyten gefunden. In Normalgallen wurden wesentlich seltener Bakterien oder Leukozyten nachgewiesen.

Es fand sich keine Korrelation zwischen Proteinaseaktivität und Proteinkonzentration (Korrelationskoeffizient $r=0.23$). Ebenfalls fand sich keine Korrelation zwischen nukleierender oder antinukleierender Galle und der Proteinaseaktivität.

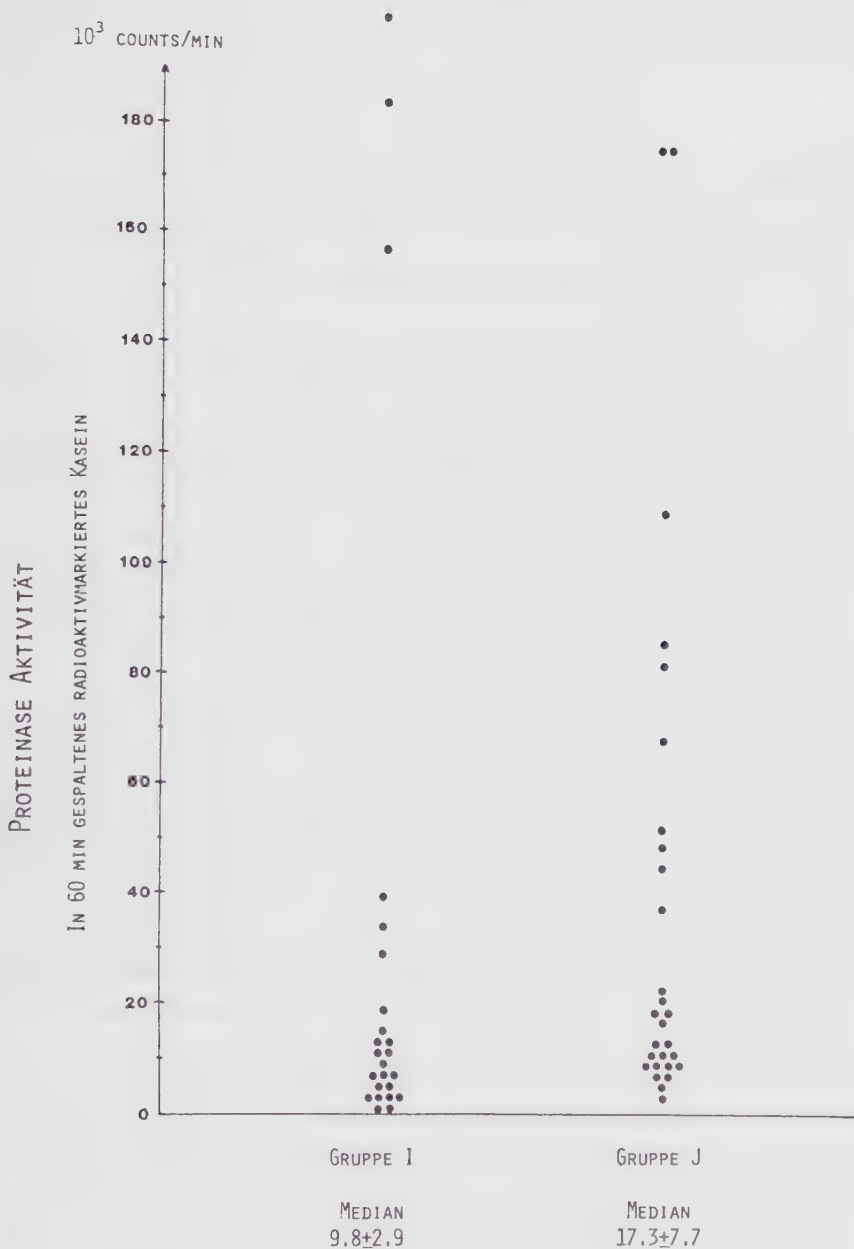


Abbildung 7:

Proteinaseaktivität in Normalblasengallen (Gruppe I) und Steinträgerblasengallen (Gruppe J). Die Mediane sind unter dem Bild aufgeführt.

Diskussion:

Entwicklung des Delipidisierungsverfahrens:

Wie in der Einleitung erwähnt, war eine unabdingbare Voraussetzung für die weitere Untersuchung der Rolle der biliären Proteine im Nukleationsprozeß eine Verbesserung der Delipidisierungsmethode. Zwei Jahre vor Beginn dieser Arbeit war im Labor von Prof. Holzbach umfangreiche Arbeit zur Entwicklung einer Delipisationsmethode für biliäre Proteine geleistet worden. Dabei waren eine Reihe von Detergentien und organische Lösungsmittel zur Anwendung gekommen sowie Molekularsieb-, Affinitäts-, und Ionenaustauschchromatographie angewandt worden. Als bestes Verfahren hatte sich damals eine Modifikation des von Helenius u.a. beschriebene Delipisationsverfahren unter Verwendung des Detergens Octylglucopyranosid in der Ultrazentrifuge erwiesen (67). Das verwendete Verfahren basierte auf dem Austausch der Gallensalze gegen ein anderes Detergens, das mit den Phospholipiden und dem Cholesterin in der Probe über 24 Stunden bei 37°C inkubiert wurde zur Bildung von gemischten Mizellen. Diese befanden sich bei der anschließenden Ultrazentrifugation auf Grund ihres geringeren Gewichtes im Sucrose-Zweistufengradienten im oberen Teil des Röhrchens, während ein Teil der Proteine im unteren Teil des Röhrchens zu finden war. Dieser wurde von der oberen getrennt und anschließend dialysiert zur Entfernung des Detergens.

Vorteil dieser Technik war die Tatsache, daß das verwendete Detergens Octylglucopyranosid nicht denaturierend auf Proteine wirkt sowie leicht dialysierbar ist.

Im Verlauf der nächsten Jahre zeigte sich, daß mit der Technik ein hoher Proteinverlust verknüpft war, normalerweise gingen 60-80% des Gesamtproteingehaltes verloren. Außerdem war das Banden-

muster einer delipidisierten Probe in der SDS-PAGE deutlich unterschiedlich von dem der Ausgangsgalle. Weitere Nachteile waren der große Zeitaufwand von 8 Tagen pro Delipidisierung und die hohen Kosten besonders für das sehr teure Octylglucopyranosid.

Ein weiterer entscheidender Nachteil zeigte sich erst während der Entwicklung der neuen Methode auf Grund vergleichender Messungen: Im den delipidisierten Proben besonders von hochkonzentrierten Gallen befanden sich noch etwas 10% der Phospholipide. Dies führt zu Interferenzen im Nukleationsassay, da Phospholipide die Nukleationszeit verlängern.

Zur Delipidisierung von Proteinen sind in der Literatur vorwiegend zwei Gruppen von Verfahren beschrieben worden:

Einmal die Extraktion der Lipide mit organischen Lösungsmitteln, wobei die Proteine in der organischen Phase unlösbar sind und entweder in der wässrigen Phase bleiben oder, falls sie vorher lyophilisiert wurden und keine wässrige Phase vorhanden ist, aus dem Sediment gewonnen werden (24,140,174).

Als organische Lösungsmittel wurden hauptsächlich Gemische aus Äther und Äthanol, Chloroform und Methanol verwendet sowie Hexan, Heptan, andere Alkohole und diverse seltene Lösungsmittel.

Die Vorteile dieser Methoden liegen in der guten Löslichkeit der meisten Lipide in diesen organischen Lösungsmitteln und der schlechten Löslichkeit der allermeisten Proteine. Dadurch ist oft eine gute Trennung zwischen der Gruppe der in der Probe vorhandenen Lipide und Proteine möglich ohne selektive Anreicherung bestimmter Proteine oder selektive Entfernung bestimmter Lipide.

Der große Nachteil dieser Methoden ist die Denaturierung sehr vieler Proteine durch viele dieser Lösungsmittel (99). Dabei sind die effektivsten Lipidlösungsmittel meist besonders denaturierend.

Zum zweiten basieren viele Delipidisierungsverfahren auf der Verwendung von Detergentien, die mit den Lipiden Mizellen bilden. Diese Mizellen können auf Chromatographiesäulen auf Grund der unterschiedlichen Größe zu den Proteinen oder in der Ultrazentrifuge auf Grund der unterschiedlichen Dichte von den Proteinen getrennt werden (66,67).

Zur Reinigung einzelner Proteine hat dieses Verfahren große Vorteile, vor allem sind viele Detergentien nicht denaturierend, erhalten die Struktur und Funktion vieler Proteine und halten diese in Lösung.

Falls aber aus einer biologischen Flüssigkeit ein breites Spektrum vieler verschiedener Proteine mit unterschiedlichster Größe isoliert werden soll, wie in unserem Fall, so tritt die Schwierigkeit auf, daß ein Teil der Proteine auf Grund ähnlicher Größe mit den entstandenen Mizellen mit diesen auf Säulen koeleuieren und auf Grund ähnlicher Dichte sich in der Ultrazentrifuge nicht von den Lipiden trennen lassen.

Weitere Nachteile sind der große Zeitaufwand und die relativ hohen Kosten sowie die schlechte Dialysierbarkeit vieler Detergentien.

Wir strebten die Entwicklung einer Technik zur Delipidisierung der biliären Proteine an, die eine hohe Ausbeute von funktionell aktiven Proteinen in praktisch lipidfreier wässriger Lösung ermöglicht. Dabei wurde eine möglichst rasche Verarbeitung der

Proben angestrebt wegen des unvermeidlichen Funktionsverlust vieler Proteine im nicht gefrorenen Zustand.

N- Butanol ist ein Alkohol, dessen besondere Eigenschaften ihm eine Sonderstellung unter den zur Delipidisierung verwendeten organischen Lösungsmittel geben. Schon seit den Fünfzigerjahren ist bekannt, daß er die Eigenschaft hat, Lipid-Protein Komplexe zu trennen ohne Denaturierung der meisten Proteine, darunter viele Enzyme (126,127,128,146), Apoproteine (168), Membranproteine (111,34,78), und daß er in niedrigen Konzentrationen sogar lebenden Zellen gegenüber nicht toxisch ist (104). Man nimmt an, daß dieser Effekt auf den polaren Eigenschaften des Butanol beruht und daß die Butanolmoleküle sich an Stelle der Lipidmoleküle setzen und so die Reaggregation von Proteinen und Lipiden sowie von Lipidmolekülen untereinander verhindern (128).

Butanol ist allerdings immer zur Reinigung einzelner Proteine verwendet worden, nie für ein breites Spektrum unterschiedlicher Proteine aus einer biologischen Flüssigkeit. Zur Gewinnung von Proteinen aus Galle ist Butanol ebenfalls noch nie verwendet worden.

Die hier beschriebene Methode basiert auf wiederholten Extraktionen der Nativgalle mit kaltem N-Butanol und darauffolgender Diafiltration unter Druck. Die Effektivität der Technik wurde an einer Serie von nicht selektierten Nativgallen erprobt. Alles Cholesterin wurde während der Extraktionen entfernt, erhebliche Mengen von Phospholipiden und Gallensalzen blieben in der wässrigen Phase. Dreitägige Dialyse unter laufendem Wasser entfernte zwar die Gallensalze, nicht aber die Phospholipide. Die Gallensalze passieren als Monomere, nicht als Mizellen die Dialysemembran. Den Diffusionsdruck bewirkt nur der in monomerer Konzentration vorliegende Anteil der Gallensalze. Deshalb dauert die

Dialyse von Gallensalzen sehr lang und erfordert sehr häufige Pufferwechsel. Phospholipide lassen sich dagegen nicht durch Dialyse entfernen, da mit zunehmender Entfernung der Gallensalze aus den gemischten Mizellen die Phospholipide große Liposomen bilden, die innerhalb der Dialysemembran bleiben.

Es fand sich, daß Diafiltration unter Druck schnell und effektiv die Gallensalze und Phospholipide entfernt. Der Mechanismus der Phospholipidentfernung ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit besteht darin, daß das in der wässrigen Phase gelöste Butanol die Reaggregation der Phospholipide zu Vesikeln verhindert und die viel kleineren Butanol-Phospholipidkomplexe die Diafiltrationsmembran passieren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß gemischte Mizellen aus Phospholipiden und Gallensalzen die Diafiltrationsmembran passieren. Ganz anders als beim Dialyseverfahren wird nämlich bei der Diafiltration durch den Druck in der Kammer Flüssigkeit durch die Membran gepreßt mit allen gelösten oder suspendierten Molekülen, deren Größe kleiner ist als die Porengröße der Membran. Die Flüssigkeitsmenge in der Kammer wird durch Nachstrom von Puffer o.a. aus einem Reservoir konstant gehalten. Im Gegensatz zur Dialyse können bei der Diafiltration Mizellen die Membran passieren, solange die CMC (Critical micellar concentration) der Gallensalze in der Flüssigkeit in der Kammer nicht unterschritten ist. Die Diafiltration ist somit wesentlich schneller zur Detergentienentfernung als die Dialyse.

Nach Erarbeitung der optimalen Bedingungen für die Delipisierung, die im Methodenteil beschrieben sind, wurde das Verfahren mit anderen bisher für Galle verwendeten Delipidisierungsverfahren verglichen, und zwar mit einer Äther/Äthanol-Extraktionstechnik und dem bisher verwendeten Detergens-Delipisierungsverfahren, das selbst vor drei Jahren mit einer Reihe von anderen Methoden verglichen worden war und als relativ besser erschien.

Dabei zeigte sich, daß das Butanolextraktions/Diafiltrationsverfahren insgesamt bessere Resultate als die anderen Methoden in Hinblick auf Proteinausbeute, Lipidentfernung, Erhaltung der Funktionstüchtigkeit von Proteinen (dieser Schluß ist z.T. aus der Literatur übernommen, da wir nur begrenzte Möglichkeiten hatten, die Funktion von Proteinen zu prüfen.), Kosten und Zeitaufwand ergab.

Diskussion der Nukleationsexperimente:

In den letzten Jahren haben mehrere Studien gezeigt, daß in nativer isotroper Blasengalle von Cholesteringallensteinträgern schneller Cholesterinkristalle entstehen als in Blasengalle von Normalpersonen bei vergleichbarem Übersättigungsgrad (25,54,71, 225). Man nimmt an, daß ein hypothetischer Nukleationsfaktor in den Steinträgergallen für diesen Unterschied verantwortlich ist. Über seine Natur und Funktion ist noch nichts bekannt.

Wichtige Determinanten der Nukleationszeit sind der Cholesterinsättigungsindex (77) und der Gesamtlipidgehalt (91). Während die Korrelation zwischen Cholesterinsättigungsindex und Nukleationszeit vor allem in Modellsystemen seit längerem bekannt ist, ist die Abhängigkeit der Nukleationszeit vom Gesamtlipidgehalt einer Modellgalle erst vor kurzem untersucht worden und bei der Interpretation der bisherigen Versuche zu den hypothetischen Nukleationsfaktoren, die mit nativer Galle durchgeführt worden waren, nicht berücksichtigt worden. Nur in Modellgallen mit genau berechnetem CSI und Gesamtlipidgehalt kann der Einfluß zusätzlicher Faktoren auf die Nukleationszeit zuverlässig bestimmt werden.

In dieser Arbeit ist deshalb großen Wert darauf gelegt worden, den Einfluß beider Größen auf die Nukleationszeit zu kontrollieren und somit nur den Einfluß möglicher Nukleations- oder Antinukleationsfaktoren auf die Nukleationszeit zu untersuchen. Wir verglichen jeweils die Nukleationszeiten von gepaarten Proben. Eine Probe enthielt den hypothetischen Nukleations- oder Antinukleationsfaktor oder beide und die andere Probe war in Hinblick auf CSI, Gesamtlipidgehalt, pH und Ionenkonzentration identisch. In der ersten Versuchsreihe ist ein Prinzip ähnlich dem von Burnstein u.a. (25) angewendet worden.

Diese Gruppe hatte Normal- und Steinträgergalle gemischt (siehe Einleitung) und die Nukleationszeiten der Mischungen mit denen der Normalgalle verglichen. Dabei war natürlich der CSI und der Gesamtlipidgehalt der Mischung von denen der Ausgangsgallen verschieden. Dies könnte in unkontrollierbarer Weise die Ergebnisse beeinflußt haben. Besonders wahrscheinlich ist dies bei den Mischungen aus Leber- und Blasengalle der Fall gewesen, da hier die Unterschiede der Gesamtlipidgehalte zwischen Ausgangsgallen und Mischungen besonders groß waren.

Wir mischten deshalb Steinträger- oder Normalgalle mit einer isotropen Modellgalle im Verhältnis 1:4. Für jede Mischung wurde eine reine Modellgalle mit möglichst gleichen CSI und Gesamtlipidgehalt konstruiert und die Nukleationszeiten dieses Probenpaares verglichen. Damit konnte nur ein in der Nativgalle vorhandener Faktor zu einem Unterschied zwischen den Nukleationszeiten der beiden Proben innerhalb eines Paares geführt haben und nicht eine Veränderung des Gesamtlipidgehaltes oder des CSI.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Nukleationszeit von Probenpaaren gemessen, die absolut identisch in jeder Hinsicht waren mit der einen Ausnahme, daß die Proteine in der einen Probe mit Proteinase verdaut worden waren. Unterschiedliche Nukleationszeiten innerhalb eines Probenpaares konnten also nur bedingt sein durch den Einfluß bestimmter Proteine in der unverdauten Probe auf die Nukleationszeit.

Aus verschiedenen Gründen wurde in der zweiten Versuchsreihe eine Rekombination von delipidisierten biliären Proteinen mit Modellgalle der Versuchsdurchführung an Nativgalle vorgezogen:

- Die Proteinverdauung ist in Nativgalle weniger zuverlässig und wahrscheinlich nicht vollständig. Proteine, die an oder in

Vesikeln lagern, werden von den Proteinasen möglicherweise nicht angegriffen. Die Bedingungen für optimale Proteinase-Wirkung (Kalziumkonzentration, pH) sind nicht gegeben.

- Der Nukleationsprozeß in übersättigter Nativgalle setzt zum Zeitpunkt der Probengewinnung ein. Die Proteinverdauung in Nativgalle beansprucht sogar mehr Zeit als die in delipidisierter Galle. Damit hätten ein Teil der Gallen schon vor der eigentlichen Nukleationszeitbestimmung nukleiert, nämlich während der Proteinverdauung.

- Nur in Modellgalle können reproduzierbar isotrope Verhältnisse geschaffen werden. Auf diesen Punkt wird später genauer eingegangen.

- Die Nukleationszeiten von übersättigten Nativgallen sind auf Grund des weiten Lipidkonzentrations- und -zusammensetzungsbereiches so variabel (zwischen einigen Stunden und einigen Wochen), daß ein sinnvoller Vergleich zwischen den Steinträger- und Normalkollektiven eine sehr hohe Probenzahl voraussetzen würde.

- Ein Großteil der Normalpersonen haben aber keine übersättigte Galle (die meisten unserer Nierenspende, von denen wir normale Blasengalle erhielten, waren jung und männlich). Diese Gallen nukleieren nicht und konnten nur auf Grund des gewählten Versuchsansatzes überhaupt verwendet werden.

- Die Proteinkonzentrationen wurden in beiden Kollektiven angeglichen. Dies ist in Nativgalle nicht möglich.

In der ersten Versuchsreihe konnte eine andere wichtige Frage geklärt werden: Ist das Nichtvorhandensein oder die Zerstörung

von Antinukleationsfaktoren für die kurzen Nukleationszeiten von Steinträgergallen verantwortlich?

Schon Burnstein's Experimente sprechen gegen das alleinige Fehlen eines Antinukleationsfaktors in der Steinträgergalle: dann müßten Mischungen aus Normal- und Steinträgergalle deutlich längere Nukleationszeiten haben als die Steinträgergallen, was in seinen Experimenten nicht der Fall war (25).

Eine Zerstörung der Antinukleationsfaktoren durch Proteinasen oder blockierende Wechselwirkungen zwischen den Antinukleations- und Nukleationsfaktoren war eine von Holzbach und Howell aufgestellte Theorie (76).

In unseren Versuchen traten deutlich kürzere Nukleationszeiten in vielen Nativ/Kunstgalle-mischungen auf verglichen mit denen der entsprechenden Modellgallen. In den Modellgallen sind keine Antinukleationsfaktoren vorhanden. Deshalb kann die raschere Nukleation in den Nativ/Modellgalle-mischungen gegenüber reinen Modellgallen weder durch Nichtvorhandensein von Antinukleationsfaktoren in einer Probe noch durch Zerstörung solcher erklärt werden.

Also müssen in vielen Steinträgergallen Faktoren vorhanden sein, die direkt den Übertritt von Cholesterin aus der mizellaren oder vesikulären Transportform in die kristalline begünstigen.

Damit sind im wesentlichen zwei mögliche Wirkmechanismen gegeben. Zum einen könnte eine heterogene Nukleation erfolgen:

Der Energieaufwand, damit ein Cholesterinmolekül aus einer übersättigten mizellaren Transportform austritt und sich mit anderen zum Cholesterinmonohydratkristall umformt, ist in einer homogenen mizellaren Lösung extrem groß. Eine solche Lösung kann deshalb

sehr hohe Übersättigungsgrade erreichen ohne daß eine Nukleation erfolgt. Ist nun ein Partikel vorhanden, das auf Grund seiner Oberflächenstruktur die Umwandlung des Cholesterins in die kristalline Struktur begünstigt, so ist der Energieaufwand viel geringer und die Nukleation erfolgt schneller und bei niedrigeren Übersättigungsgraden. Ein solches geeignetes Partikel ist zum Beispiel ein Cholesterinmonohydratkristall.

Eine weitere Möglichkeit für die Beschleunigung der Nukleation besteht in der Förderung der Fusion von Vesikeln, also der Beschleunigung der homologen Nukleation. Es ist aus Studien mit synthetischen Liposomen bekannt, daß verschiedene Substanzen, unter diesen Kalzium (139,79) und eine Reihe von Proteinen und Polysacchariden (46,120,138,164,176,196,200,199,211), die Fusion solcher Liposomen fördern und daß andere Proteine die Fusion verlangsamen, darunter Apoproteine (33,95,106,111, 34,138,199,200). Die Nukleationsfaktoren könnten also solche fusionsbeschleunigende Proteine sein und sich an die in übersättigter Galle vorhandenen Cholesterin-Lezithinvesikel anlagern. In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Schachter u.a. besonders interessant. Diese Gruppe zeigte, daß die Fusion künstlicher Cholesterin-Lezithinvesikel durch hochmolekulare Dextranmoleküle, die sich an die Vesikel anlagern, beschleunigt wird. Analog könnten Gallenblasenmuzine, ebenfalls hochmolekulare Polysaccharide, die Fusion von Vesikeln fördern. Kürzlich wurde gezeigt, daß solche Muzine Lezithin und Cholesterin in Modellgallen binden (193).

Zwischen diesen Möglichkeiten kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

Bisher durchgeführte Nukleationsstudien zum Vergleich des Nukleationsverhaltens von Steinträger- und Normalgalle wurden besonders in einem Punkt kritisiert: In den meisten Steinträgergallen sind zum Zeitpunkt der Probengewinnung Cholesterinmonohydratkristalle vorhanden, in den Normalgallen dagegen nicht. Da solche vorhandenen Kristalle die Nukleation von weiteren Kristallen extrem beschleunigen, müssen vor Beginn der Nukleationszeitmessung alle solche Kristalle entfernt werden. Ob dies durch Filtern und Zentrifugieren wirklich befriedigend gelingt, ist bis heute immer wieder ein Diskussionspunkt. Um das Vorhandensein von submikroskopischen Cholesterinkristallen in den Steinträgergallen auszuschließen, wurde in dieser Arbeit ein neuer Ansatz gewählt. In der ersten Versuchsreihe wurde die Nativgalle nicht nur zentrifugiert und gefiltert wie in bisherigen Nukleationsstudien, sondern die Nativ/Kunstgalle-mischungen wurden unmittelbar nach dem Mischen bei 37°C weitere 18 Stunden bei 50°C inkubiert. Dabei wird der Nukleationsprozeß umgekehrt wegen der viel höheren Transportkapazität der Modellgalle für Cholesterin bei höheren Temperaturen (117). Es können sich Cholesterinmonohydratkristalle und Mikroaggregate von Vesikeln und liquid crystals auflösen und rein mizellare Lösungen entstehen, je nach Lezithinanteil in der Lösung mit Anwesenheit von kleinen unilamellären Vesikeln.

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Anwesenheit von submikroskopischen Cholesterinmonohydratkristallen aus der Steinträgergalle ebenfalls ausgeschlossen. In diesen Experimenten wurden alle Nativgallen delipidisiert, und während der Delipidisation werden auch alle Cholesterinkristalle entfernt.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß lediglich unspezifisch denaturierte Proteine als nukleationsfördernde Faktoren wirken, wurden Steinträger- und Normalgallen nebeneinander verwendet und die Proteinkonzentrationen in beiden Kollektiven gleich hoch

gehalten. Der deutliche Unterschied in der Nukleationsgeschwindigkeit der beiden Gruppen kann damit nur auf einer Anreicherung spezifischer nukleationsfördernder Substanzen in den Steinträgergallen beruhen.

Die Ergebnisse der ersten Versuchreihe weisen einen nukleationsbeschleunigenden Effekt in den meisten Blasengallen von Cholesterinsteinträgern nach, aber auch in den untersuchten Gallen von Patienten mit Cholecystitis ohne Steinnachweis.

In der zweiten Versuchsreihe wurden aus den meisten Blasengallen von Cholesterinsteinträgern lipidfreie Fraktionen gewonnen, die die Nukleation in Modellgallen stark beschleunigten. Entsprechende Fraktionen aus Normalblasengallen und aus Lebergallen von Normalpersonen und Steinträgern zeigten diesen Effekt nicht. Proteinverdauung beseitigte den nukleationsfördernden Effekt in den delipidisierten Blasengallen von Steinträgern. Sie hatte keinen Einfluß auf die Nukleationszeiten der Rekombinaten aus Leber- und Blasengalle von Normalpersonen und aus Lebergalle von Steinträgern. Das verwendete Proteinasengemisch Pronase allein hatte in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Nukleationszeit.

Aus diesen Ergebnissen schließen wir, daß in der Gallenblase der meisten Cholesterinsteinträger Proteine in die Galle freigesetzt werden, die die Bildung von Cholesterinkristallen beschleunigen und deren Anwesenheit, wenigstens zum Teil, der Grund ist für das unterschiedliche Nukleationsverhalten von normaler und Steinträgerblasengalle.

Strasberg's Gruppe fand kürzlich eine höhere Gesamtproteinkonzentration in der Blasengalle von Steinträgern als von Normalpersonen, während Holzbach u.a. eine etwas niedrigere gefunden hatten.

Wir fanden keinen signifikanten Konzentrationsunterschied der Proteine in der Nativgalle. Da in der vorliegenden Studie keine Nukleationszeiten von Nativgallen gemessen wurden, kann zu den anderen Studien keine Stellung genommen werden. In unseren Rekombinaten waren die Proteinkonzentrationen beider Gruppen im gleichen Bereich. Der deutliche Unterschied in der Nukleationsgeschwindigkeit zwischen Steinträger- und Kontrollrekombinaten spricht für die Anreicherung bestimmter nukleationsfördernder Proteine und gegen eine unspezifische Wirkung des Gesamtprotein-gehaltes allein.

Schon früher ist vermutet worden, daß der Nukleationsdefekt von Steinträgergallen in der Gallenblase seinen Ursprung hat. Man hatte nämlich festgestellt, daß die meisten Lebergallen von Gallensteinträgern einen höheren Übersättigungsgrad hatten als die Blasengallen derselben Patienten und trotzdem langsamer nukleierten (54). Mischte man nun Blasengalle eines Steinpatienten zu seiner Lebergalle, so war die Nukleationszeit dieses Gemisches deutlich kürzer als die der Lebergalle (25). Dies nahm man als Hinweis, daß ein Nukleationsfaktor in der Blasengalle vorhanden war.

Vor kurzem wurde in Prof. Holzbach's Labor gezeigt, daß Modellgallen mit niedrigem Gesamtlipidgehalt lange Nukleationszeiten haben trotz sehr hoher Übersättigungsgrade (91). Der Grund für die langen Nukleationszeiten in schwachkonzentrierten Gallen liegt wahrscheinlich in der Entstehung von stabilen Cholesterin-Lezithinvesikeln unter diesen Bedingungen.

In Pilotstudien zu der ersten Versuchsreihe hatte sich gezeigt, daß kleine Erhöhungen des Gesamtlipidgehaltes im Bereich von 1g/dl die Nukleationszeit von schwachkonzentrierten Modellgallen stark verkürzen, auch wenn der Übersättigungsgrad konstant gehalten

ten wird. Damit treten die beim Mischen von Leber- und Blasengalle beschriebenen Phänomene auch beim Mischen reiner Modellgallen auf, wenn auch möglicherweise in unterschiedlichem Ausmaß, und sind noch kein Beweis für den Ursprung des Nukleationsfaktors in der Gallenblase.

In der vorliegenden Studie fand sich in den Blasengallen von Cholesterinsteinträgern ein durch Proteine vermittelter nukleationsfördernder Effekt, der in den Lebergallen von Steinträgern nicht nachweisbar war, obwohl die Proteinkonzentration in den aus Lebergalle gewonnenen Proben auf das doppelte der Proteinkonzentration in den Proben aus Blasengallen angehoben worden war. Deshalb folgern wir, daß die nukleierenden Proteine erst in der Gallenblase in die Galle gelangen.

Elektrophoretisch wurde eine stärker ausgeprägte Bande im 70 000 Dalton Molekulargewichtsbereich festgestellt in den delipidisierten Gallen, die die Nukleations beschleunigt hatten. Diese Bande könnte eines der nukleationsfördernden Proteine oder eine Unter-einheit davon darstellen. Zum Beispiel besteht menschliches Gallenblasenmucin aus 70 000 Dalton Proteinuntereinheiten. Aber auch Albumin mit 68 000 Dalton Molekulargewicht könnte das Protein sein, das die Bande darstellt. Auf jeden Fall liegt nur ein Konzentrationsunterschied dieses Proteins zwischen Normal- und Steinträgergallen vor und nicht ein völliges Fehlen des Proteins in Normalgalle. Das paßt gut zu der Beobachtung, daß auch delipidierte Normalgalle nukleationsfördernd wirkt, wenn sie auf einen unphysiologisch hohen Proteingehalt konzentriert wird, zum Beispiel auf das 3-4fache.

Hochmolekulare Proteine können aber auf den angewandten Gradientengelen schlecht differenziert werden.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse erhebt sich die Frage, ob das nukleationsfördernde Protein menschliches Gallenblasenmucin ist. Vieles spricht dafür: es wird in der Gallenblase gebildet, hat eine 70 000 Dalton Untereinheit (145) und, wie vor kurzem gezeigt werden konnte, wirkt in vitro nukleationsfördernd (105).

Außerdem bestehen umfangreiche Untersuchungen über die Rolle von Muzinhypersekretion bei der Entstehung von Cholesteringallensteinen im Tiermodell (siehe auch Einleitung). Wieweit im Menschen Gallenblasenmucin bei der Entstehung von Gallensteinen eine Rolle spielt, ist noch unbekannt.

In unserer Studie fand sich kein Unterschied in der Glykoproteinkonzentration zwischen Normal- und Steinträgergalle, ein Ergebnis, zu dem schon andere Gruppen kamen (224,54). Genau wie diese Gruppen hatten wir allerdings den Gesamtglykoproteingehalt der Gallen gemessen und nicht speziell die hochmolekularen Gallenblasenmucine. Um diese eigens in ihrer Konzentration zu messen, sind größere Gallenmengen erforderlich als uns zur Verfügung standen. Wir fanden auch keine Korrelation zwischen der Glykoproteinkonzentration und dem Ausmaß der Nukleationsbeschleunigung in der ersten und der zweiten Versuchsreihe. Es fehlt uns aber die getrennte Bestimmung des Gallenblasenmucingehaltes in den Proben unserer Versuche.

Auch in unseren Versuchen, vor allem in der zweiten Versuchsreihe, war die Gesamtglykoproteinkonzentration wesentlich geringer als die Minimalkonzentration von Gallenblasenmucin, die in ähnlichen Modellsystemen zu einer Nukleationszeitverkürzung geführt hatte (105). Vor allem hatten wir Proben mit starker nukleierender Wirkung und sehr niedrigem Glykoproteingehalt.

Es ist deshalb wahrscheinlich, daß noch andere biliäre Proteine die Cholesterinnukleations beschleunigen. Eine weitere Charakterisierung dieser Proteine wird angestrebt. Eine andere Möglichkeit ist, daß Gallenblasenmucin von Steinträgern strukturell verschieden ist von dem von Normalpersonen. Bekannt ist bis jetzt nur, daß der sulfatierte Anteil des Gallenblasenmucins bei Steinträgern höher ist (112).

Es ist noch unbekannt, ob die nukleationsfördernden Proteine vor der Gallensteinentstehung bereits in die Galle abgegeben werden und ihre Entstehung und ihr Wachstum begünstigen, oder ob eine Irritation der Gallenblasenschleimhaut durch den vorhandenen Stein ihre Freisetzung fördern.

Wir fanden in den vier untersuchten Gallen von Patienten mit Cholecystitis ohne Steinnachweis ebenfalls einen ausgeprägten nukleationsfördernden Effekt. Es könnte also eine Schleimhautschädigung unabhängig von der einwirkenden Noxe zur Freisetzung solcher nukleierender Proteine führen, aber es ist offensichtlich noch viel zu früh, um diese Frage beantworten zu können. Interessant sind in diesem Zusammenhang die vor kurzem vorgetragenen Ergebnisse der Gruppe von Neiderhiser u.a. (8): Sie lösten experimentell im Tiermodell eine Cholecystitis aus und fanden, daß die Proteinsekretion in der Gallenblase daraufhin stark ansteigt. Ein Großteil dieser Proteine waren Glykoproteine. Andere Gruppen hatten gefunden, daß in experimentell ausgelöster Cholecystitis vermehrt Lysolezithin freigesetzt wird (169), daß Lysolezithin die Bildung von Arachidonsäure stimuliert, und daß Arachidonsäure über die Prostaglandine, in die sie umgewandelt wird, die Sekretion von Gallenblasenmucin anregt (97). Kürzlich fand man erhöhte Konzentrationen von Lysolezithin in der lithogenen Galle von Präriehunden (98). Lysolezithin verändert die Eigenschaften von künstlichen Cholesterin-Phospholipidvesikeln stark (90,93) und

könnte auch so den Nukleationsvorgang beeinflussen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, nehmen diese Tiere aber normalerweise kein Cholesterin zu sich und haben auch keinen Mechanismus im Darm, der die Aufnahme von Cholesterin regeln könnte. Damit besteht die Möglichkeit, daß das exogene exzessiv resorbierte Cholesterin im Präriehund zu Vorgängen führt, die sich überhaupt nicht auf den Menschen übertragen lassen. Denn dieser nimmt auch normalerweise exogen zugeführtes Cholesterin auf, ist mit Regelmechanismen für die exogene Cholesterinaufnahme ausgestattet und es entstehen spontan Gallensteine im Menschen. Auch führt im Präriehund Cholesterinfütterung regelmäßig zu einer lithogenen Galle, exzessiver Muzinsekretion in der Gallenblase und der Entstehung von Cholesteringallensteinen. Im Menschen dagegen, der zu 50% eine übersättigte Galle hat, ohne Gallensteine oder Muzinhypersekretion oder beides zu entwickeln, sind die Vorgänge, die letztlich zur Entstehung von Gallensteinen führen, mit Sicherheit komplex und wohl durch Zusammenwirken einer Reihe von Faktoren bedingt. Zu diesen gehören Übersättigung der Galle mit Cholesterin als bekanntester und am meisten untersuchter Faktor, aber wahrscheinlich auch Gallenblasenstase und das Vorhandensein von nukleierenden und antinukleierenden Faktoren.

Unabhängig davon, ob die nukleationsfördernden Proteine zur Entstehung der Gallensteine geführt haben oder nicht, hat ihr Vorhandensein in der Galle der Steinträger eine wichtige Konsequenz. Die neuen therapeutischen Ansätze zur Gallensteinbehandlung wie die Litholyse mit Gallensalzen oder Äther und die extracorporale Zertrümmerung durch Schockwellen zielen alle auf das Entfernen der Steine unter Erhaltung der Gallenblase hin. Man weiß inzwischen, daß die Rezidivrate hoch ist. Das Verhindern der erneuten Steinentstehung wird maßgeblich sein für den Erfolg dieser neuen Therapieverfahren. Die weitere Erforschung der Natur der nukleierenden Proteine und des Mechanismus ihrer Freisetzung wird hof-

fentlich zur Entwicklung einer effektiven Rezidivprophylaxe führen.

Zusammenfassung:

Die Entstehung von Cholesteringallensteinen hat als Voraussetzung die Übersättigung der Galle mit Cholesterin und als kritischen ersten Schritt die Nukleation von Cholesterinmonohydratkristallen in der übersättigten Galle.

Zur Sekretion einer übersättigten Galle führen eine Reihe von erblichen und erworbenen metabolischen Störungen, die entweder eine relative Hypersekretion von Cholesterin im Verhältnis zur Gallensalz- und Lecithinsekretion bewirken oder eine relative Hyposekretion von Gallensalzen.

Warum aber nur ein Teil der Personen, deren Galle mit Cholesterin übersättigt ist, auch Cholesterinkristalle und Steine bilden, ist unbekannt und seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß sich in der Blasengalle von Cholesterinsteinträgern viel schneller Cholesterinkristalle bilden als in ähnlich übersättigter Blasengalle von Normalpersonen. Die Ursache für diesen Unterschied in der Nukleationsgeschwindigkeit ist unbekannt. Es liegen Hinweise vor für das Vorhandensein von nukleationsfördernden und antinukleierenden Substanzen in der Galle, über deren Natur und Wirkungsmechanismus bisher wenig bekannt ist.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung des unterschiedlichen Nukleationsverhaltens von normaler und Steinträgergalle.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Existenz von nukleationsfördernden Substanzen in der Blasengalle von Cholesterinsteinträgern untersucht. Dazu wurden kleine Mengen nativer Steinträger-

und Normalgalle mit übersättigter isotroper Kunstgalle im Verhältnis 1:4 (vol/vol) gemischt. Gleichzeitig wurde für jedes Nativ/Kunstgallegemisch eine reine Kunstgalle hergestellt mit gleichem Übersättigungsgrad und gleichem Gesamtlipidgehalt. Anschließend wurden die Nukleationszeiten der Proben bestimmt. Es zeigte sich, daß die meisten Steinträgergallen die Nukleationszeiten der Gemische signifikant ($p < 0.001$) verkürzten im Vergleich zu den Nukleationszeiten der reinen Kunstgallen gleichen Übersättigungsgrades. Normalgalle veränderte die Nukleationszeit des Gemisches nicht im Vergleich zu der reinen Kunstgalle.

Die Ergebnisse sprechen für das Vorhandensein einer nukleationsfördernden Substanz in der Mehrzahl der Blasengallen von Cholesterinsteinträgern.

Als nächstes wurde eine nähere Charakterisierung dieses Faktors angestrebt. Wichtigste Kandidaten für einen solchen Faktor in der menschlichen Galle sind die biliären Proteine, die Pigmente und die Mukopolysaccharide. Schon in der ersten Versuchsreihe hatte sich keine Korrelation zwischen der Bilirubinkonzentration oder der Glykoproteinkonzentration und dem Ausmaß der Nukleationsbeschleunigung gezeigt. Um die Rolle der biliären Proteine im Nukleationsprozeß zu untersuchen, mußte ein Delipidisationsverfahren entwickelt werden, mit dem diese Proteine möglichst ohne Funktionsverlust von den Gallelipiden getrennt werden konnten. Auf Grund des großen Anteils sehr polarer Lipide hatten sich die herkömmlichen Delipidisierungsverfahren für Lipoproteine und Membranproteine als unzureichend oder denaturierend erwiesen.

Das entwickelte Delipidisierungsverfahren beruht auf wiederholten Extraktionen der nativen Galle mit kaltem n-Butanol und anschließender Diafiltration unter Druck. Es wurde an einer Reihe von unselektierten Gallen getestet und mit anderen für Gallepro-

teine bereits verwendeten Delipidisierungsmethoden verglichen. Es zeigte sich, daß das Butanolextraktions/Diafiltrationsverfahren insgesamt bessere Resultate erzielte in Hinblick auf Proteinausbeute, Lipidentfernung, Erhaltung der Funktionstüchtigkeit, Kosten und Zeitaufwand.

In der zweiten Versuchsreihe wurden mit dieser Methode Blasengalle von Normalpersonen und Steinträgern delipidisiert. Die Proteinkonzentrationen wurden im Steinträger- und Normalkollektiv angeglichen. Aus jeder delipidisierten Galle wurde ein identisches Probenpaar hergestellt und die Proteine in einer der beiden Proben mit einem Proteinasegemisch hydrolysiert. Anschließend wurden die lyophilisierten Probenpaare mit einer isotropen übersättigten Kunstgalle rekombiniert und die Nukleationszeiten der Probenpaare bestimmt.

Es zeigte sich, daß in dem meisten aus Steinträrgergalle hergestellten Probenpaaren die Nukleationszeit der Probe, in der die Proteine verdaut worden waren, um ein Vielfaches länger war als die der identischen Probe mit intakten Proteinen. Die Proben in jeder Hinsicht identisch waren außer der Proteinverdauung in nur einer Probe, und das Proteinasegemisch hatte in der verwendeten Konzentration keinen Einfluß auf die Nukleationszeit.

In den aus delipidisierten Normalgallen hergestellten Probenpaaren fand sich kein Unterschied in den Nukleationszeiten der verdauten und der unverdauten Probe.

Deshalb kann gefolgert werden, daß in den meisten Blasengallen von Cholesterinsteinträgern Proteine vorhanden sind, die die Nukleation von Cholesterinkristallen stark beschleunigen.

Als nächstes wurde untersucht, ob diese Proteine in der Leber oder der Gallenblase in die Galle gelangen. Werden die Proteine

in der Leber in die Galle ausgeschieden, so sollten auch aus Lebergalle von Steinträgern gewonnene Gesamtproteinlösungen die Nukleation beschleunigen und dieser Effekt sollte durch Proteinverdauung beseitigt werden.

In einer nächsten Versuchsreihe wurde deshalb Lebergalle von Steinträgern und Normalpersonen mit der entwickelten Delipidisationsmethode entfettet und die Proteinkonzentration auf den in Blasengallen üblichen Bereich angehoben. Danach wurden die gleichen Versuche durchgeführt wie in der zweiten Versuchsreihe.

Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Nukleationszeiten der verdauten und der unverdauten Probe, und zwar weder in aus Steinträger- noch aus Normallebergalle hergestellten Proben. Auch die Nukleationszeiten der unverdauten Proben waren im Steinträger- und Normalkollektiv gleich.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die nukleationsfördernden Proteine in der Gallenblase in die Galle gelangen.

Anschließend wurde das Proteinmuster der delipidisierten Gallen elektrophoretisch untersucht, um eine eventuelle Anreicherung eines bestimmten Proteins in den Gallen, die eine nukleationsbeschleunigende Wirkung gezeigt hatten, zu entdecken. Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich eine wesentlich stärker ausgeprägte Bande im 70 000 Dalton Molekulargewichtsbereich in den meisten Proben, die die Nukleation beschleunigt hatten. Dieses Protein könnte der Untereinheit von Gallenblasenmucin entsprechen. Höhermolekulare Proteine konnten auf den verwendeten Gradientengelen nicht differenziert werden.

Es fand sich kein Unterschied im Glykoproteingehalt zwischen Normal- und Steinträgerkollektiv und keine Korrelation zwischen

dem Ausmaß der Nukleationsbeschleunigung und der Glykoproteinkonzentration. Die Konzentration von Gallenblasenmucin konnte aber nicht selektiv bestimmt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß in der Gallenblase der meisten Cholesterinsteinträger Proteine in die Galle abgegeben werden, die die Nukleationszeit stark verkürzen und, zumindest zum Teil, für den ausgeprägten Unterschied der Nukleationsgeschwindigkeiten von Steinträger- und Normalgallen verantwortlich sind.

Literaturverzeichnis:

- 1.) Abaurre R, Gordon SG, Mann JG, Kern F Jr: Fasting bile salt pool size and composition after ileal resection. Gastroenterology 57:679, 1969
- 2.) Admirand WH, Small DM: The physicochemical basis of Cholesterol gallstone formation in man. J Clin Invest. 47:1043, 1968
- 3.) Ahlberg J, Angelin B, Björkhem I, Einarsson K, Leijd B: Hepatic cholesterol metabolism in normo- and hyperlipidemic patients with cholesterol gallstones. J Lipid Res 20:107, 1979
- 4.) Ahlberg J, Angelin B, Einarsson K, Hellström K, Leijd B: Prevalence of gallbladder disease in hyperlipoproteinemia. Am J Dig Dis 24:459, 1979
- 5.) Ahlberg J, Angelin B, Einarsson K, Hellström K, Leijd B: Biliary lipid composition in normo- and hyperlipoproteinemia. Gastroenterology 79:90, 1980
- 6.) Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC: Enzymatic determination of total serum cholesterol. J Clin Chem 20:470, 1974
- 7.) Andrews E, Schoenheimer R, Hrdina L: Etiology of gallstones. I. Chemical factors and the role of the gallbladder. Arch Surg 25:796, 1932

- 8.) Antonelli K, Neiderhieser DH: Protein secretion by the rabbit gallbladder. *Gastroenterology* 88:1682, 1985 (Abstract)
- 9.) Bartlett GR: Phosphorus assay by column chromatography. *J Biol Chem* 234:466, 1959
- 10.) Bateson MC, Maclean D, Ross PE, Bouchier IAD: Clofibrate therapy and gallstone induction. *Am J Dig Dis* 23:623, 1978
- 11.) Been JM, Bills PM, Lewis D: Microstructure of gallstones. *Gastroenterology* 76:548, 1979
- 12.) Bennion LJ, Grundy SM: Effects of obesity and caloric intake on biliary lipid metabolism in man. *J Clin Invest* 56:996, 1975
- 13.) Bennion LJ, Ginsberg RL, Garnick MB, Bennet PH: Effects of oral contraceptives on the gallbladder of normal women. *N Engl J Med* 294:189, 1976
- 14.) Bennion LJ, Grundy SM: Effects of diabetes mellitus on cholesterol metabolism in man. *N Engl J Med* 296:1365, 1977
- 15.) Bennion LJ, Drobny E, Knowler WC, Ginsberg RL, Garnick MB, Adler RD, DUane WC: Sex differences in the size of bile acid pools. *Metabolism* 27:961, 1978
- 16.) Bennion LJ, Grundy SM: Risk factors for the development of cholelithiasis in man. *N Engl J Med* 299:1161 (1. Teil), 1221 (2. Teil), 1978

- 17.) Bennion LJ, Knowler WC, Mott DM, Spagnola Am, Bennet PH: Development of lithogenic bile during puberty in Pima Indians. N Engl J Med 300:873, 1979
- 18.) Bouchier IAD, Cooperband SR, El Kodsí BM: Mucous substances and viscosity of normal and pathological human bile. Gastroenterology 49:343, 1966
- 19.) Bouchier IAD: Biochemistry of gallstone formation. Clin Gastroenterol 12:25, 1983
- 20.) Bourges M, Small DM, Devichian DG: Biophysics of lipidic associations. III. The quaternary systems lecithin-bile salt-cholesterol-water. Biochim Biophys Acta 144:189, 1967
- 21.) Boysen J: Galdestenenes Struktur of Pathogenese. Kjobenhavn, 1900
- 22.) Braverman DZ, Johnson ML, Kern F Jr: Effects of pregnancy and contraceptive steroids on gallbladder function. N Engl J Med 302:362, 1980
- 23.) Brown RO: A study on the etiology of cholecystitis and its production by the intravenous injection of streptococci. Arch Intern Med 23:185, 1919
- 24.) Brown WV, Levy RI, Fredrickson DS: Studies of the proteins in human plasma very low density lipoproteins. J Biol Chem 244:5687, 1969

- 25.) Burnstein MJ, Ilson RG, Petrunka CN, Taylor RD, Strasberg SM: Evidence for a potent nucleating factor in the gall-bladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 85:801, 1983
- 26.) Carey MC, Small DM: Studies on artificial bile. Influence of composition, counterion concentration and time on the properties of bile salt-lecithin micelles. *Gastroenterology* 58:1057, 1970
- 27.) Carey MC, Small DM: The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. *Amer J Med* 49:590, 1970
- 28.) Carey MC, Small DM: Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Arch Intern Med* 130:506, 1972
- 29.) Carey MC, Small DM: The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. *J Clin Invest* 61:988, 1978
- 30.) Carey MC: Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J Lipid Res* 19:945, 1978
- 31.) Carey MC, Leighton LS: Formation of cholesterol gallstones. In: Bouchier IAD, Allan RN, Hodgson HJF, Keighley MRB eds. *Textbook of Gastroenterology*. Eastbourne: Bailliere Tindall, 1984
- 32.) Castell JV, Cervera M, Marco R: A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A re-examination of the conditions of reaction. *Anal Biochem* 99:379, 1979

- 33.) Chen C, Albers JJ: Characterization of proteoliposomes containing apoprotein A-I: A new substrate for the measurement of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 23:680, 1982
- 34.) Cherry RJ, Berger KU, Chapman D: Interaction of erythrocyte apoprotein with bimolecular lipid membranes. *Biochem Biophys Res Comm* 44:644, 1971
- 35.) Claffey WJ, Holzbach RT: Dimorphism in bile salt-lecithin mixed micelles. *Biochemistry* 20:415, 1981
- 36.) Cohen S, Kaplan M, Gottlieb J et al: Liver disease and gallstones in regional enteritis. *Gastroenterology* 60:237, 1971
- 37.) Cushing HW: Typhoidal cholecystitis and cholelithiasis. *Johns Hopkins Med J* 9:91, 1898
- 38.) Dam H, Kruse I, Prange I, Kalleheuge HE, Fenger HJ, Jensen MK: Studies on human bile. III. Composition of duodenal bile from healthy young volunteers compared with the composition of bladder bile from surgical patients with and without uncomplicated gallstone disease. *Z Ernährungswiss* 10:160, 1971
- 39.) DenBesten L, Connor WE, Bell S: The effect of dietary cholesterol on the composition of human bile in healthy subjects. *Surgery* 73:266, 1973

- 40.) DeVries AL, Lin Y: Structure of a peptide antifreeze and mechanism of adsorption to ice. *Biochim Biophys Acta* 495:388, 1977
- 41.) DeVries AL: Antifreeze peptides and glycopeptides in cold-water fishes. *Ann Rev Physiol* 45:245, 1983
- 42.) Doty JE, Pitt HA, Kuchenbecker SL, Porter-Fink V, Den Beston LW: Role of gallbladder mucus in the pathogenesis of cholesterol gallstones. *Am J Surg* 145:54, 1983
- 43.) Dowling RH, Bell GD, White J: Lithogenic bile in patients with ileal disfunction. *Gut* 13:514, 1972
- 44.) Duvaldestin P, Mahu J-L, Metreau J-M, Arondel J, Preaux A-M, Berthelot P: Possible role of a defect in hepatic bilirubin glucuronidation in the initiation of cholesterol gallstones. *Gut* 21:650, 1980
- 45.) Einarsson K, Hellström K, Kallner M: Gallbladder disease in hyperlipoproteinemia. *Lancet* 1:484, 1975
- 46.) Eytan GD: Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim Biophys Acta* 694:185, 1982
- 47.) Feeney RE, Yeh Y: Antifreeze proteins from fish bloods. *Adv Protein Chem* 32:191, 1978
- 48.) Fiske CH, Subbarow Y: The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375, 1925
- 49.) Forslind E, Kjellander R: A structure model for the lecithin-cholesterol-water membrane. *J Theor Biol* 51:97, 1975

- 50.) Forte TM, Nichols AV, Gong EL, Lux S, Levy RI: Electron microscopic study on reassembly of plasma high density apoprotein with various lipids. *Biochem Biophys Acta* 248:381, 1971
- 51.) Freston JW, Bouchier IAD, Newman J: Biliary mucosa substances in dihydrocholesterol induced cholelithiasis. *Gastroenterology* 57:670, 1969
- 52.) Galliger S, Harvey PRC, Strasberg SM: Human gallbladder bile proteins: Evidence for a role in the nucleation defect of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology* 88:1659, 1985 (Abstract)
- 53.) Gilat T, Somjen GJ: Direct quantitation of phospholipid vesicles and their cholesterol content in human bile. *Gastroenterology* 88:1661, 1985 (Abstract)
- 54.) Gollish Sh, Burnstein JM, Ilson RG, Petrunka CN, Strasberg SM: Nucleation of cholesterol monohydrate crystals from hepatic and gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gut* 24:836, 1983
- 55.) Grundy SM, Metzger AL, Adler RD: Mechanism of lithogenic bile formation in American Indian women with cholesterol gallstones. *J Clin Invest* 51:3026, 1972
- 56.) Grundy SM, Duane WC, Adler RD, Aron JM, Metzger AL: Biliary lipid outputs in young women with cholesterol gallstones. *Metabolism* 23:67, 1974

- 57.) Grundy SM: Effects of polyunsaturated fats on lipid metabolism in patients with hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 55:269, 1975
- 58.) Grundy SM, Mok HYI: Colestipol, clofibrate and phytosterols in combined therapy of hyperlipidemia. *J Lab Clin Med* 89:354, 1977
- 59.) Guo LSS, Hamilton RL, Goerke J, Weinstein JN: Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res* 21:993, 1980
- 60.) Gurantz D, Laker MF, Hofmann AF: enzymatic measurement of choline-containing phospholipids in bile. *J Lipid Res* 22:373, 1981
- 61.) Halpern Z, Dudley MA, Lynn MP, Breuer AC, Holzbach RT: Rapid vesicle formation and aggregation in abnormal human biles: A time-lapse video-enhanced and polarizing light microscopy study. *Gastroenterology* 88:1663, 1985 (Abstract)
- 62.) Hamilton RL, Williams MC, Fielding CJ, Havel RJ: Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J Clin Invest* 58:667, 1976
- 63.) Hartley GS (1936). *Actualités sci. industr.* P. 387, zitiert in Rains AJH: Researches concerning the formation of gallstones. *Br J Med* 2:685, 1962
- 64.) Heaton KW, Read AE: Association of gallstones with disorders of the terminal ileum. *Gut* 10:414, 1969

- 65.) Hegardt FG, Dam H: The solubility of cholesterol in aqueous solutions of bile salts and lecithin. *Z Ernährungswiss* 10:223, 1971
- 66.) Helenius A, Simons K: Removal of lipids from human plasma low-density lipoprotein by detergent. *Biochemistry* 10, 2542, 1971
- 67.) Helenius A, Fries E, Kartenbeck J: reconstitution of Semliki Forest virus membrane. *J Cell Biol* 75:866, 1977
- 68.) von Helmsbach M: *Mikrogeologie*. Berlin, Reimer 1856
- 69.) Hill Gh, Mair WSJ, Goligher JC: Gallstones after ileostomy and ileal resection. *Gut* 16:932, 1975
- 70.) Hoenders HJ, Schoenmakers JGG, Gerding JJT, Tesser GI, Bloemendal H: N-Terminus of alpha crystallin. *Exp Eye Res* 7:291, 1968
- 71.) Holan KR, Holzbach RT, Mermann RE, Cooperman AM, Claffey WJ: Nucleation time: A key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology* 77:611, 1979
- 72.) Holzbach RT, Marsh M, Olzewski M, Holan K: Cholesterol solubility in bile: Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* 52:1467, 1973
- 73.) Holzbach RT, Pak CYC: Metastable supersaturation. *Am J Med* 56:141, 1974

- 74.) Holzbach RT, Corbusier C, Marsh M, et al: The process of cholesterol cholelithiasis induced by diet in the prairie dog: A physicochemical characterization. J Lab Clin Med 87:987, 1976
- 75.) Holzbach RT, Corbusier C: Liquid crystals and cholesterol nucleation during equilibration in supersaturated bile analogs. Biochim Biophys Acta 528:436, 1978
- 76.) Holzbach RT, Thiel E, Marsh M: Lack of nucleation inhibition activity in proteins from abnormal bile. Hepatology 3:820, 1983 (Abstract)
- 77.) Holzbach RT, Kibe A, Thiel E, Howell JH, Marsh M, Hermann RE: Biliary proteins: unique inhibitors of cholesterol crystal nucleation in human gallbladder bile. J Clin Invest 73:35, 1984
- 78.) Hurst H: Asymmetrical behaviour of insect cuticle in relation to water permeability. Disc. Faraday Soc. 3:93, 1948
- 79.) Ingolia TD, Koshland DE Jr: The role of calcium in fusion of artificial vesicles. J Biol Chem 253:3821, 1978
- 80.) Inoue K, Kitagawa T: Effect of exogenous lysolecithin on liposomal membranes-its relation to membrane fluidity. Biochim Biophys Acta 363:361, 1974
- 81.) Isaakson B: On the lipid constituents of normal bile. Acta Soc Med Ups 56: 307, 1951

- 82.) Isaakson B: On the lipid constituents of bile from human gallbladder containing cholesterol gallstones. A comparison with normal human bladder bile. Acta Soc Med Ups 59:277, 1954
- 83.) Isaakson B: On the lipids and bile acids in normal and pathological bladder bile. A study of the main cholesterol dissolving components of human bile. Dissertation. Universität G theburg, Lund, Schweden, 1954
- 84.) Isaakson B: On the dissolving power of lecithin and bile salts for cholesterol in human bladder bile. Acta Soc Med Ups 59:296, 1954
- 85.) Isaakson B: On the main cholanic acids of human bile from normal gallbladder and from gallbladder associated with cholesterol stones. Acta Soc Med Ups 59:307, 1954
- 86.) Ito H, Coe FL: Acidic peptide and polyribonucleotide crystal growth inhibitors in human urine. Am J Physiol 233:455, 1977
- 87.) Jonas A, Krajnovich DJ: Effect of cholesterol on the formation of micellar complexes between bovine A-I apolipoprotein and L-2-dimyristoylphosphatidylcholine. J Biol Chem 253:5758, 1978
- 88.) Juniper K Jr, Burson EN: Biliary tract studies. II. The significance of biliary crystals. Gastroenterology 32:175, 1957
- 89.) Keilin D, Hartree EF: Activity of the cytochrome System in heart muscle preparations. Biochem J 41:500, 1947

- 90.) Kibe A, Holzbach RT, LaRusso NF, Mao SJT: Inhibition of cholesterol crystal formation by apolipoproteins in super-saturated model bile. *Science* 225:514, 1984
- 91.) Kibe A, Marsh M, Holzbach RT, McMahon JT: Cholesterol crystal nucleation time in model bile: opposing effects of dilution and calcium. *Hepatology* 3:819, 1983 (Abstract)
- 92.) Kibe A, Breuer AC, Holzbach RT: Cholesterol nucleation in human bile by video-enhanced contrast-differential interference microscopy. The role of vesicles in metastable supersaturation. *Gastroenterology* 86:1326, 1984 (Abstract)
- 93.) Kitagawa T, Inoue K, Nojima S: Properties of liposomal membranes containing lysolecithin. *J Biochem* 79:1123, 1976
- 94.) Krejs GJ, Orci L, Conlon JM: Somatostatinoma syndrome. Biochemical, morphological and clinical features. *N Engl J Med* 301:285, 1979
- 95.) Krupp L, Chobanian AV, Brecher PI: The in vivo transformation of phospholipid vesicles to a particle resembling HDL in the rat. *Biochem Biophys Res Comm* 72:1251, 1976
- 96.) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227:680, 1970
- 97.) LaMont JT, Turner BS, DiBenedetto D, Handin R, Schafer AI: Arachidonic acid stimulates mucin secretion in prairie dog gallbladder. *Am J Physiol* 245:92, 1983

- 98.) LaMorte WW, LaMont JT, Booker ML, Turner B, Hale W, Scott T: Prostaglandins and lysolethicin as stimulators of gallbladder mucin hypersecretion prior to cholelithiasis. *Gastroenterology* 88:1673, 1985 (Abstract)
- 99.) Lee DM, Valente AJ, Kuo WH, Maeda H: Properties of apolipoprotein B in urea and in aqueous buffers. *Biochim Biophys Acta* 666:133, 1981
- 100.) Lee SP, Lim TH, Scott AJ: Carbohydrate moieties of glycoproteins in human hepatic gallbladder bile, gallbladder mucosa and gallstones. *Clin Sci* 56:533, 1979
- 101.) Lee SP, LaMont JT, Carey MC: Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones. *J Clin Invest* 67:1712, 1981
- 102.) Lee SP, Carey MC, LaMont JT: Aspirin prevention of cholesterol gallstone formation in prairie dogs. *Science* 211:1429, 1981
- 103.) Lee DM, Valente AJ, Kuo WH, Maeda H: Properties of apolipoprotein B in urea and in aqueous buffers: The use of glutathione and nitrogen in its solubilization. *Biochim Biophys Acta* 666:133, 1981
- 104.) LeGrue SJ, Kahan BD and Pellis NR: Extraction of a murine tumor-specific transplantation antigen with 1-butanol. I. Partial purification by isoelectric focusing. *J Clin Invest* 65:191, 1980

- 105.) Levy PF, Smith BF, LaMont JT: Human gallbladder mucin accelerates nucleation of cholesterol in artificial bile. *Gastroenterology* 87:270, 1984
- 106.) Lockshin A, Burris RH: Solubilization and properties of chloroplast lamellar protein. *Proc Natl Acad Sci US* 56:1564, 1966
- 107.) Long JH, Gephart F: On the behaviour of lecithin with bile salts, and the occurrence of lecithin in bile. *J Amer Chem Soc* 30:1312, 1908
- 108.) Lonsdale K: Epitaxy as a growth factor in urinary calculi and gallstones. *Nature* 217:56, 1966
- 109.) Low-beer TA, Pomare EW: Regulation of bile salt pool size in man. *Br Med J* 2:338, 1973
- 110.) Mabee TM, Meyer P, DenBesten L, Mason EE: The mechanism of increased gallstone formation in obese human subjects. *Surgery* 79:460, 1976
- 111.) Maddy AH: The properties of the protein of the plasma membrane of ox erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 117:193, 1966
- 112.) Maki T, Matsushiro T, Susuki N, Nakamura N: Role of sulfated glycoprotein in gallstone formation. *Surg Gynecol Obstet* 132:846, 1971
- 113.) Malloy HT, Evelyn KA: The determination of bilirubin with the photo- electric colorimeter. *J Biol Chem* 119:481, 1937

- 114.) Mann FG, Higgins GM: Effect of pregnancy on emptying of the gallbladder. Arch Surg 15:522, 1927
- 115.) Mazer NA, Carey MC, Kwasnik RF, Benedek GB: Quasielastic light- scattering studies of micelle formation and cholesterol precipitation in model bile solutions. In: Gallstones. Fisher MM, Goresky CA, Shaffer EA, Strasberg SM, Herausgeber. Plenum Press, New York. 143-150, 1979
- 116.) Mazer NA, Benedek GB, Carey MC: Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile-salt lecithin solutions. Biochemistry 19:601, 1980
- 117.) Mazer NA, Carey MC: Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Cholesterol solubilization and precipitation in model bile solutions. Biochemistry 22:426, 1983
- 118.) Mazer NA, Schurtenberger P, Carey MC, Preisig R, Weigand K, Känzig W: Quasielastic light scattering studies of native bile from the dog. Comparison with aggregative behaviour of biliary lipid systems. Biochemistry 23:1994, 1984
- 119.) Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation on cerebrospinal fluid proteins. Science (Wash. DC) 211:1437, 1981
- 120.) Minetti M, Aducci P, Viti V: Interaction of neutral polysaccharides with phosphatidylcholine multilamellar liposomes. Phase transition studied by the binding of fluorescein-conjugated dextrans. Biochemistry 18:2541, 1979

- 121.) Mok HYI, von Bergmann K, Grundy SM: Regulation of pool size of bile acids in man. *Gastroenterology* 73:684, 1977
- 122.) Mok HYI, von Bergmann K, Grundy SM: Effects of interruption of enterohepatic circulation on biliary lipid secretion in man. *Am J Dig Dis* 23:1067, 1978
- 123.) Moore EW, Celic L, Ostrow JD: Interactions between ionized calcium and sodium taurocholate: bile salts are important buffers for prevention of calcium-containing gallstones. *Gastroenterology* 83:1079, 1982
- 124.) Moore EW, Ostrow JD, Hofman AF: Pathogenesis of calcium-containing gallstones: A unifying hypothesis on the structural requirements of Ca^{++} -binding by bile salts. *Gastroenterology* 88:1679, 1985 (Abstract)
- 125.) Moore EW, Rege RV: Pathogenesis of calcium-containing gallstones: Is canine bile supersaturated with CaCO_3 ? *Gastroenterology* 88:1679, 1985 (Abstract)
- 126.) Morton RK: Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature* 166:1092, 1950
- 127.) Morton RK: Alkaline phosphatase of milk: 2. Purification of the enzyme. *Biochem J* 55:795, 1953
- 128.) Morton RK: Methods of extraction of enzymes from animal tissues. In: *Methods in Ezymology*, Colowick SP, Kaplan NO, Herausgeber, vol 1:40-51, Academic press , New York, 1955

- 129.) Mosbach EH, Salen G: Bile acid biosynthesis. Pathways and regulation. *Am J Dig Dis* 19:920, 1974
- 130.) Müller K: Structural dimorphism of bile salt-lecithin mixed micelles. A possible regulatory mechanism for cholesterol solubility in bile. X-ray structure analysis. *Biochemistry* 20:404, 1981
- 131.) Mufson D, Meksuwan K, Zarembo JE, et al: Cholesterol solubility in lecithin-bile salt systems. *Science* 177:701, 1972
- 132.) Myant NB, Mitropoulos KA: Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res* 18:135, 1977
- 133.) Nakayama F: Cholesterol holding capacity of bile in relationship to gallstone formation. *Clin Chim Acta* 14:171, 1966
- 134.) Nakayama F, Van der Linden W: Bile from gallbladder harbouring gallstones. Can it indicate stone formation? *Acta Chir Scand* 136:605, 1970
- 135.) Nakagawa Y, Margolis HC, Yokoyama S, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL: Purification and characterization of a calcium oxalate monohydrate crystal growth inhibitor from human kidney tissue culture medium. *J Biol Chem* 256:3936, 1981
- 136.) Naunyn B: A treatise on cholelithiasis. New Sydenham Soc, London 1896

- 137.) Nichols AV, Gong EL, Blanche PJ, Forte TM: Characterization of discoidal complexes of phosphatidylcholine, apolipoproteins A-I and cholesterol by gradient disc gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* 750:353, 1983
- 138.) Ohki S, Leonards K: Effects of proteins on phospholipid vesicle aggregation and lipid vesicle-monolayer interactions. *Chemistry and Physics of Lipids* 31:307, 1982
- 139.) Ohki S: Effects of divalent cations, temperature, osmotic pressure gradient and vesicle curvature on phosphatidylserine vesicle fusion. *J Membrane Biol* 77:265, 1984
- 140.) Olofsson S-O, McConathy WJ, Alaupovic P: Isolation and partial characterization of a new acidic apolipoprotein (apolipoprotein F) from high density lipoproteins of human plasma. *Biochemistry* 17:1032, 1978
- 141.) Olszewski MF, Holzbach RT, Saupe A, et al: Liquid crystals in human bile. *Nature* 242:336, 1973
- 142.) Osuga T, Mitamura K, Miyagawa S, Sato N, Kintaka S, Portman OW: A scanning electron microscope study of gallstone development in man. *Lab Invest* 31:696, 1974
- 143.) Papahadjopoulos D, Cowden M, Kimelberg H: Role of cholesterol in membranes: Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochem Biophys Acta* 330:8, 1973

- 144.) Papahadjopoulos D, Hui S, Vail HJ, Poste G: Studies on membrane fusion: I. Interactions of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide. *Biochim Biophys Acta* 448: 245 1976
- 145.) Pearson JP, Kaura R, Taylor W, Allen A: The composition and polymeric structure of mucus glycoprotein from human gallbladder bile. *Biochim Biophys Acta* 706:221, 1982
- 146.) Penn N, Mackler B: Microsomal DPNH cytochrome C reductase. *Biochim Biophys Acta* 27:539, 1958
- 147.) Pertsemlidis D, Panveliwalla D, Ahrens EH Jr: Effects of clofibrate and of an estrogen-progestin combination on fasting biliary lipids and cholic acid kinetics in man. *Gastroenterology* 66:565, 1974
- 148.) Pope JL: Crystallization of sodium taurocholate. *J Lipid Res* 8:146, 1967
- 149.) Potter MG: Observations of gallbladder and bile during pregnancy at term. *JAMA* 106:1070, 1936
- 150.) Pownall HJ, Massey JB, Kusserow SK, Gotto AM Jr: Kinetics of lipid-protein interactions: Effect of cholesterol on the association of human plasma high-density apolipoprotein A-I with L- α -dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 18:574, 1979
- 151.) Quintao E, Grundy SM, Ahrens EH Jr: Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res* 12:233, 1971

- 152.) Rains AHJ: Concerning the formation of gallstones. Gastroenterologia 83:18, 1955
- 153.) Rajagopalan N, Lindenbaum S: The binding of Ca^{++} to taurin- and glycin-conjugated bile salt micelles. Biochim Biophys Acta 711:66, 1982
- 154.) Raymond JA, DeVries AL: Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. Proc Natl Acad Sci USA 74:2589, 1977
- 155.) Redinger RN, Small DM: Bile composition, bile salt metabolism and gallstones. Arch Intern Med 130:618, 1972
- 156.) Reid MS, Bielecki RL: A simple apparatus for vertical flatsheet polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 22:374, 1968
- 157.) Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program: Oral contraceptives and venous thromboembolism, surgically confirmed gallbladder disease, and breast tumors. Lancet 1:1399, 1973
- 158.) Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance program, Boston University Medical Center: Surgically confirmed gallbladder disease, venous thromboembolism, and breast tumors in relation to post-menopausal estrogen therapy. N Engl J Med 290:15, 1974
- 159.) Report from the Coronary Drug Project Research Group: Gallbladder disease as a side effect of drugs influencing lipid metabolism. N Engl J Med 296:1185, 1977

- 160.) Riegel C, Radvin IS, Johnston CH: Studies in gallbladder function. IV. The absorption of bile salts and cholesterol from the bile-free gallbladder. *Am J Physiol* 99:656, 1932
- 161.) Riegel C, Ravdin IS, Morrison PJ, et al: Studies of gallbladder function. XI. The composition of gallbladder bile in pregnancy. *JAMA* 105:134, 1935
- 162.) Rosenow EC: The etiology of cholecystitis and gallstones and their production by the intravenous injection of bacteria. *J infect Dis* 19:527, 1916
- 163.) Roslyn JJ, Pitt HA, Mann LL, Arvent ME, DenBesten L: Gallbladder disease in patients on long term parenteral nutrition. *Gastroenterology* 84:148, 1983
- 164.) Rossi JD, Wallace BA: Binding of fibronectin to phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 258:3327, 1983
- 165.) Rous P, McMaster PD, Drury DR: Observations on some causes of gallstone formation. I. Experimental cholelithiasis in the absence of stasis, infection and gallbladder influences. *J Exp Med* 89:77, 1924
- 166.) Rovsing T: Weitere Beiträge zur Pathogenese der Gallensteinkrankheit. *Acta Chir Scand* 56:207, 1923
- 167.) Roy CC, Weber AM, Morin CL, Combes J-C, Nussle D, Megevand A, LaSalle R: Abnormal biliary lipid composition in cystic fibrosis: Effect of pancreatic enzymes. *N Engl J Med* 297:1301, 1977

- 168.) Rudman D, Garcia LA Howard CH: A new method for isolating the nonidentical protein subunits of human plasma alpha-lipoprotein. *J Clin Inv* 49:365, 1970
- 169.) Rutledge FA, Hickman DM, Dunn JJ, Frey CF, Matson RS: Lysophosphatidylcholine acyltransferase activity during experimental cholelithiasis. *Lipids* 16:714, 1981
- 170.) Saad HY, Higuchi WI: Water solubility of cholesterol. *J Pharmaceut Sci* 54:1205, 1965
- 171.) Salen G, Grundy SM: The metabolism of cholestanol, cholesterol and bile acids in cerebrotendinous xantomathosis. *J Clin Invest* 52:2822, 1973
- 172.) Sarles H, Hauton J-C, Planche NE, Lafont H, Gerolami A: Diet, cholesterol gallstones and composition of the bile. *Am J Dig Dis* 15:251, 1970
- 173.) Sarles H, Crotte C, Gerolami A, Mule A, Domingo N, Hauton J-C: The influence of caloric intake and of dietary protein on the bile lipids. *Scand J Gastroenterol* 6:189, 1971
- 174.) Scanu A, Lewis LA, Bumpus FM: Separation and characterization of the protein moiety of human alpha-lipoprotein. *Arch Biochem* 74:390, 1958
- 175.) Scanu AM, Edelstein C: Solubility in aqueous solutions of ethanol of the small molecular weight peptides of the serum very low density and high density lipoproteins. Relevance to the recovery problem during delipidation of serum lipoproteins. *Anal Biochem* 44:576, 1971.

- 176.) Schachter D: Aggregation of liposomes by dextrans of high molecular weight. *Biochem Biophys Res Comm* 84:840, 1978
- 177.) Schersten T: Formation of lithogenic bile in man. *Digestion* 9:540, 1973
- 178.) Schurtenberger P, Mazer NA, Känzig W, Preisig R: Quasielastic light scattering studies of the micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salt and lecithin. In: *Proceedings of the International Symposium on Surfactants in Solution*, Lund, Sweden; Mittal KL Herausgeber, Plenum Press. 2:841, 1984
- 179.) Sedaghat A, Grundy SM: Cholesterol crystals and the formation of cholesterol gallstones. *N Engl J Med* 302:1274, 1980
- 180.) Sewell RB, Mao SJT, Kawamoto T, LaRusso NF: Apolipoproteins of high, low and very low density lipoproteins in human bile. *J Lipid Res* 24:391, 1983
- 181.) Shaffer EA, Braasch JW, Small DM: Bile composition at and after surgery in normal persons and patients with gallstones. *N Engl J Med* 287:1317, 1972
- 182.) Shaffer EA, Small DM: Gallstone disease: Pathogenesis and management. *Curr Probl Surg* 13:1, 1976 (July)
- 183.) Shaffer EA, Small DM: Biliary lipid secretion in cholesterol gallstone disease. The effect of cholecystectomy and obesity. *J Clin Invest* 59:828, 1977

- 184.) Small DM, Bourges M, Dervichian: Ternary and quaternary aqueous systems containing bile salt, lecithin and cholesterol. *Nature* 211:816, 1966
- 185.) Small DM, Bourges M: Lyotropic paracrystalline phases obtained with ternary and quaternary systems of amphiphilic substances in water: Studies on aqueous systems of lecithin, bile salt and cholesterol. *Mol Cryst* 1:541, 1966
- 186.) Small DM: Physicochemical studies of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* 52:607, 1968
- 187.) Small DM: A physical chemical approach to bile. In: Schiff L, Carey J, Dietschy J Herausgeber: Bile salt metabolism. Springfield, Illinois, Charles C Thomas Publishers, pp223-42, 1969
- 188.) Small DM: The formation of gallstones. *Advances Intern Med* 16:243, 1970
- 189.) Small DM, Rapo S: The source of abnormal bile in patients with cholesterol gallstones. *N Engl J Med* 283:53, 1970
- 190.) Small DM, Dowling RH, Redinger RN: The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch Intern Med* 130:522-73, 1972
- 191.) Small DM: Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation. *N Engl J Med* 302:1305, 1980
- 192.) Smallwood RA, Jablonski P, Watts McK: Intermittent secretion of abnormal bile in patients with cholesterol gallstones. *Br Med J* 4:263, 1972

- 193.) Smith BF, LaMont JT: Purified human gallbladder mucin (HGM) binds lecithin (PL) and cholesterol (Ch) in model bile. Gastroenterology 88:1695, 1985 (Abstract)
- 194.) Somjen GJ, Gilat T: A non-micellar mode of cholesterol transport in human bile. FEBS letters 156:265, 1983
- 195.) Spiro RG: Analysis of sugars found in glycoproteins. In: Methods of Enzymology, Neufeld EF, Ginsberg V, Herausgeber, Academic Press, New York, pp 3-26, 1966
- 196.) Sunamoto J, Iwamoto K, Kondo H: Liposomal membranes. VII. Fusion and aggregation of egg lecithin liposomes as promoted by polysaccharides. Biochem Biophys Res Comm 94:1367, 1980
- 197.) Sutor DJ, Percival JM: Presence or absence of inhibitors of crystal growth in bile. Gut 17:506, 1976
- 198.) Swell L, Gregory DH, Vlahcevic ZR: Current concepts of the pathogenesis of cholesterol gallstones. Med Clin No Am 58(6), 1971
- 199.) Szoka F Jr, Papahadjopoulos D: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Ann Rev Biophys Bioeng 9:467, 1980
- 200.) Szoka F, Papahadjopoulos D: Liposomes: Preparation and characterization. In: Liposomes: From physical structure ot therapeutic applications. Research monographs in cell and tissue physiology, vol 7, pp51-82, Knight (Herausgeber), Elsevier, North Holland Biomedical Press, 1981

- 201.) Tall AR, Small DM, Shipley GG, Lees RS: Apoprotein stability and lipid-protein interactions in human plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:4940, 1975
- 202.) Tall AR, Shipley GG, Small DM: Conformational and thermodynamic properties of A-I of human plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem* 251:3749, 1976
- 203.) Tamasue N, Inoue T, Juniper K J: Solubility of cholesterol in bile salt-lecithin model systems. *Am J Dig Dis* 18:670, 1973
- 204.) Tera H: Stratification of human gallbladder bile in vivo. *Acta Chir Scand Suppl* 256:1, 1960
- 205.) Tera H: Sedimentation of bile constituents. *Ann Surg* 157:468, 1963
- 206.) Thudichum JLW: A treatise on gallstones. London, John Churchill and Sons, 1863
- 207.) Thureborn E: Human hepatic bile: Composition changes due to an altered enterohepatic circulation. *Acta Chir Scand suppl* 303:1, 1962
- 208.) Thureborn E: Formation of gallstones in man. *Arch Surg* 92:952, 1965
- 209.) Tsofina LM, Liberman EA, Babakov AV: Production of bimolecular protein-lipid membranes in aqueous solutions. *Nature* 212:681, 1966

- 210.) Turley SD, Dietschy JM: Re-evaluation of the 3-a-hydroxy-steroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J Lipid Res* 19:924, 1978
- 211.) Tyrrell DA, Heath TD, Colley CM, Ryman BE: New aspects of liposomes. *Biochim Biophys Acta* 457:259, 1976
- 212.) Udenfriend S, Stein S, Böhlen P, Dairman W, Leimgruber W, Weigle M: Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range. *Science* 178:871, 1972
- 213.) Ulloa N, Garrido J, Nervi F: Vesicular carriers of biliary cholesterol (Ch): Ultracentrifugal isolation and morphological evidence in native bile. *Gastroenterology* 88:1701, 1985 (Abstract)
- 214.) Valdivieso V, Palma R, Nervi F, Covarrubias C, Severin C, Antezana C: Secretion of biliary lipids in young Chilean women with cholesterol gallstones. *Gut* 20:997, 1979
- 215.) Van der Linden W, Lindelöf G: The familial occurrence of gallstone disease. *Acta Genet Statist* 15:159, 1965
- 216.) Van der Linden W, Simonson H: Familial occurrence of gallstone disease: Incidence in parents of young patients. *Hum Hered* 23:123, 1973
- 217.) Varani J, Johnson K, Kaplan J: Development of a solid-phase assay for measurement of proteolytic enzyme activity. *Anal Biochem* 107: 377, 1980

- 218.) Vlahcevic ZR, Bell CC Jr, Swell L: Significance of the liver in the production of lithogenic bile in man. *Gastroenterology* 59:62, 1970
- 219.) Vlahcevic ZR, Bell CC Jr, Buhac I, Farrar JT, Swell L: Diminished bile acid pool size in patients with gallstones. *Gastroenterology* 59:165, 1970
- 220.) Wahlin T: Effects of lithogenic diets on mouse gallbladder epithelium. *Virchows Arch B Cell Path* 22:273, 1976
- 221.) Watkins JB, Tercyak AM, Szczepanik P, Klein PD: Bile salt kinetics in cystic fibrosis: Influence of pancreatic enzyme replacement. *Gastroenterology* 68:1087, 1975
- 222.) Weber Am, Roy CC, Morin CL, LaSalle R: Malabsorption of bile acids in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 289:1001, 1973
- 223.) Whiting MJ, Down RH, Watts JMcK: Biliary crystals and granules, the cholesterol saturation index, and the prediction of gallstone type. *Surg Gastroenterol* 1:17, 1982
- 224.) Whiting MJ, Watts JMcK: Cholesterol crystal formation and growth in model bile solutions. *J Lipid Res* 24:861, 1983
- 225.) Whiting MJ, Watts JMcK: Supersaturated bile from obese patients without gallstones supports cholesterol crystal growth but not nucleation. *Gastroenterology* 86:234, 1984
- 226.) Womack N, Zeppa R, Irvin G: The anatomy of gallstones. *Ann Surg* 157:670, 1963

- 227.) Womack NA: The development of gallstones. Surg Gynecol Obstet 133:937, 1971
- 228.) Zak RA, Frenkiel PG, Marks JW, Bonorris GG, Allan A, Schoenfield LJ: Cyclic nucleotides and glycoproteins during formation of cholesterol gallstones in prairie dogs. Gastroenterology 87:263, 1984

Tabellarischer Lebenslauf

Name	Ursula Seidler
Geboren	22.10.1958 in München
Familienstand	ledig
Eltern	Bernhard und Margrit Seidler, Rechtsanwälte
Geschwister	Barbara und Gisela Seidler
1965 - 1969	Volksschule Baldham
1969 - 1977	St. Anna Gymnasium, München
Mai 1977	Abitur
1977 - 1985	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
März 1978	Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes
Frühjahr 1980	Physikum
Frühjahr 1981	1.Teil des Staatsexamens
Frühjahr 1983	2.Teil des Staatsexamens
1983/1984	Forschungsaufenthalt an der Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio
Herbst 1983	Amerikanisches ECFMG Examen
Frühjahr 1985	3.Teil des Staatsexamens
Mai 1985	Approbation

